

UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y QUÍMICA TÉCNICA
FACULTAD DE CIENCIAS



**DISEÑO DE ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN ORIENTADA Y
ESTABLE DE METALOENZIMAS REDOX SOBRE ELECTRODOS
NANOESTRUCTURADOS**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE CATÁLISIS Y PETROLEOQUÍMICA



TESIS DOCTORAL
CRISTINA GUTIÉRREZ SÁNCHEZ

Lda. Ciencias Químicas

Madrid 2012

UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y QUÍMICA TÉCNICA
FACULTAD DE CIENCIAS

**DISEÑO DE ESTRATEGIAS DE INMOVILIZACIÓN ORIENTADA Y
ESTABLE DE METALOENZIMAS REDOX SOBRE ELECTRODOS
NANOESTRUCTURADOS**

Memoria presentada por la licenciada

Cristina Gutiérrez Sánchez

Para optar al grado de doctor en Ciencias Químicas

DIRECTOR

**Dr. Antonio López De Lacey. Instituto de Catálisis y
Petroleoquímica. CSIC**

CODIRECTOR

**Dr. Marcos Pita Martínez. Instituto de Catálisis y Petroleoquímica.
CSIC**

TUTORA

**Prof. Rosa M. Martín Aranda. Universidad Nacional de Educación a
Distancia. UNED**

A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer, en primer lugar al Dr. Antonio López De Lacey por darme la posibilidad de realizar esta tesis doctoral en su grupo de investigación. Su dirección y orientación durante todos estos años.

Al Prof. Víctor M. Fernández por su continuo ánimo, consejos y su diarios “Buenos días Cristinita”.

También me gustaría agradecer a la Prof. Rosa M. Martín Aranda por introducirme en la investigación y transmitirme su pasión investigadora.

Agradecer también a la Dra. Inês A. C. Pereira de la Universidade Nova de Lisboa-ITQB y al Dr. Sergey Shleev y Prof. Taut Ruzgas de la Universidad de Malmö, Suecia. Por haberme acogido tan amablemente en sus laboratorios para la realización de las diferentes estancias y la supervisión recibida durante aquellos meses.

Agradecer al departamento de Química Inorgánica y Química Técnica, UNED por haberme solucionado todos los trámites requeridos y al Instituto de Catálisis por todos los servicios prestados.

A mis compañeros del laboratorio, a Olaf por ponerme en contacto por primera vez con la electroquímica y sus conocimientos de vinos, a Cristina, a Marcos por sus rápidas correcciones, a Carla, Álvaro y Marío por el día a día. Especialmente a David, Pablo, Ileana, Musta, y Oscar por los buenos momentos compartidos, sus continuos ánimos y consejos y su paciencia. Y a los compañeros de otros laboratorios, Fernando, Pamela, Bárabara, Lucía, Euge, Patri, David, Diana, Eva, Oscar, Vanesa, Ricardo, Mercedes, María, Mónica, Jesús y Álvaro. También quiero recordar a las amistades realizadas durante mis estancias doctorales, a Edu, Marta, Filipa, Bruno, Alejandro, Marilu, Víctor, Magnus, Laura, Yulia y Javier.

Quisiera agradecer también a todos mis amigos de siempre, de Toledo, Muriel y Madrid, su amistad después de tantos años. Y a Edu por sus continuos ánimos para que empezara a redactar esta tesis.

A mi familia por estar siempre a mi lado, el apoyo continuo e incondicional de mis padres, incluso en momentos difíciles. A mi hermana y Alberto por sus consejos, y escucharme siempre y en cualquier momento. A mi tía Chus, que le hubiera encantado estar el día de la defensa. A Álvaro y David, que han hecho que me olvide de cualquier problema sacándome siempre una sonrisa.

Gracias a todos

ABREVIATURAS

- ABTS: 2,2'-azodobis-3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico
- 4-ATP: 4-aminofenol
- AFM : Microscopía de Fuerzas Atómicas
- AuNP : Nanopartículas de oro
- CNT: Nanotubos de carbono
- ECD : N-etil-N-dimetilaminopropil-carbodiimida
- Hasa: Hidrogenasa
- HOPG : Grafito pirolítico altamente ordenado
- K_M : Constante de Michaelis-Menten
- LDG : Grafito de baja densidad
- MH: 6-mercapto-1-hexanol
- MV: Metil Viológeno
- NHE : Electrodo normal de hidrógeno
- NHS : N-hidroxisuccinimida
- SAM : Monocapa autoensamblada
- TED : Transferencia Electrónica Directa
- TEM : Microscopía de Transmisión Electrónica
- TM : Transferencia Electrónica Mediada

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Bioelectrocatalisis y nanotecnología	1
1.2. Funcionalización de superficies	2
1.3. Inmovilización de enzimas	7
1.4. Enzimas	12
1.4.1. Hidrogenasas	12
1.4.2. Lacasas	17
1.5. Transferencia electrónica enzimática	21
1.6. Aplicaciones electrocatalíticas de lacasas e hidrogenasas	23
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Materiales	35
3.1.1. Reactivos, disolventes y gases	35
3.1.2. Material y equipos de laboratorio	37
3.1.3. Soportes de inmovilización	38
3.1.4. Enzimas	39
3.2.4.1. Extracción y purificación de hidrogenasas	39
3.2.4.2. Lacasa Trametes hirsuta	41
3.2.4.3. Peroxidasa de Rábano tipo (HRP)	42
3.2. Métodos	42
3.2.1. Métodos analíticos de identificación de hidrogenasa	42
3.2.2. Espectroscopía infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)	42
3.2.3. Medidas de actividad	43
3.2.3.1. Preparación de la muestra de hidrogenasa	43
3.2.3.2. Ensayo de Intercambio isotópico D^+/H^+	43
3.2.3.3. Ensayo de consumo de H_2	43
3.2.3.4. Producción de H_2	44
3.2.4. Ensayo actividad de lacasa	44
3.2.5. Detección de agua oxigenada	44
3.2.6. Funcionalización de electrodos	45

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, Hasa DvH	59
4.1. Purificación de la hidrogenasa de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	59
4.2. Caracterización por FTIR	62
4.4. Inmovilización de Hasa DvH sobre electrodos de carbono	72
4.4.1. Modificación del electrodo de carbono con sal de diazonio de 4-nitrofenilo	73
4.4.2. Reducción de HOPG-ArNO ₂ a HOPG-ArNH ₂	74
4.4.3. Inmovilización de Hasa DvH sobre los electrodos HOPG-ArNH ₂	75
4.5. Inmovilización de Hasa DvH sobre electrodos de oro	79
4.5.1. Pretratamiento	79
4.5.2. Modificación química	81
4.5.3. Inmovilización de hidrogenasa	82
4.5.3.1. Inmovilización covalente de Hasa D. V. Hildenborough a Au-4-ATP	82
4.5.3.2. Inserción de Hasa DvH en una bicapa fosfolipídica soportada sobre oro	87
4.5.3.3. Co-Inmovilización de Hasa D. V. Hildenborough y fosfolípidos	94
4.6. Conclusiones	99
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, LACASA TH	103
5.1. Electrodos de carbono	103
5.1.1. Electrodos de grafito de baja densidad, LDG	103
5.1.1.1. Funcionalización de electrodos LDG	104
5.1.1.2. Inmovilización de lacasa sobre electrodos LDG-NH ₂	107
5.1.1.3. Estabilidad operacional	116
5.1.1.4. Inhibición por haluros de los electrodos de lacasa	117
5.1.1.5. Biosensor de oxígeno	119
5.1.2. Electrodos de grafito modificados con nanotubos de carbono, 3D-CNT/CMF	121
5.1.3. Conclusiones	132
5.2. Electrodos de oro modificados con lacasa	134
5.2.1. Caracterización de electrodos planos de oro	134
5.2.2. Funcionalización de los electrodos planos de oro	134

5.2.2.1. Caracterización de la monocapa mixta de 4-aminofenilos/6-mercaptohexanol	141
5.2.3. Unión covalente de lacasa	146
5.2.3. Electrodo de oro mesoporoso	157
5.2.5. Conclusiones	170
5.3. Electrodo LDG-AuNP	172
5.3.1 Preparación de la superficie	172
5.3.1.1. Funcionalización del electrodo	172
5.3.1.2. Caracterización de los electrodos modificados y estudio del tiempo de incubación de AuNP	175
5.3.2. Inmovilización de lacasa Th	181
5.3.2.1. Influencia del diámetro de las AuNP	186
5.3.3. Inhibición por haluros	188
5.3.4. Estabilidad operacional	190
5.3.5. Conclusiones	191
6. CONCLUSIONES	195
7. BIBLIOGRAFÍA	201

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Bioelectrocatalisis y nanotecnología

La bioelectrocatalisis es un término empleado para señalar procesos electroquímicos donde están involucrados sistemas biológicos en la aceleración de las reacciones. La bioelectrocatalisis directa posibilita la interacción del centro activo de la enzima con el electrodo intercambiando electrones, es decir el electrodo actúa como sustrato de la enzima. Este fenómeno se denomina también como transferencia electrónica directa (TED) (Berezin, I. V. y col., 1978).

La integración de enzimas redox en sistemas nanoestructurados tiene gran interés para el desarrollo de aplicaciones en biosensores, biopilas de combustible, dispositivos nanobioelectrónicos y procesos nanobiocatalíticos (Baron, R. y col., 2007) (Willner, I. y col., 2007). La organización controlada a nivel molecular de los diferentes componentes de un dispositivo bioelectrónico permite la optimización de sus propiedades funcionales. Por otro lado, en los estudios fundamentales de interacciones intermoleculares, transferencia electrónica, catálisis y fenómenos fotoelectrónicos de moléculas biológicas es fundamental aplicar nano-metodologías que gocen de suficiente resolución para entender y controlar los procesos a escala molecular.

En los últimos años, ha habido un gran auge en el desarrollo de materiales nanoestructurados en el campo de la biotecnología. Las nanopartículas y otros nanomateriales como nanohilos, nanotubos de carbono, grafeno, nanofibras, etc. han recibido considerable atención (Li, N. y col., 2007). Esas partículas son de tamaños comparables a biomoléculas tales como virus (20-500 nm), proteínas (5-50 nm) o secuencias de DNA (2 nm de ancho y de 10-100 nm de largo). Por lo tanto es muy interesante la integración de ambos tipos de elementos. La inmovilización de enzimas sobre estos nanomateriales de manera controlada permite combinar las propiedades catalíticas de las primeras con las propiedades electrónicas, ópticas y mecánicas de las

segundas, las cuales en muchos casos sólo aparecen a nivel nanoscópico (Katz, E.y col., 2004). Para la combinación de biocatalizadores enzimáticos con nanomateriales es recomendable la funcionalización de estos últimos, lo cual implica un dominio de su química superficial que permita establecer interacciones específicas con las enzimas a utilizar. De este modo se evita la desnaturalización que en muchos casos sufre la enzima al adsorberse directamente sobre el soporte, y lo que es más importante, permite optimizar su recubrimiento y orientación para aumentar las propiedades catalíticas del sistema híbrido enzima-nanomaterial (Alonso-Lomillo, M. A.y col., 2007). Otra ventaja de la funcionalización de las superficies es que se pueden hacer a medida para cada sistema material-enzima.

1.2. Funcionalización de superficies

La inmovilización de enzimas sobre superficies funcionalizadas adecuadamente favorece la orientación de enzimas por diversos tipos de interacciones (electroestáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, quelatantes etc.) y puede permitir la unión covalente de la enzima al electrodo (Ghazi, I.y col., 2005) (Grazú, V.y col., 2010). Además, puede evitar la desnaturalización de la enzima al adsorberse directamente sobre la superficie desnuda del electrodo, especialmente cuando se trata de oro. Existen diferentes estrategias para la funcionalización de superficies, las cuales dependen de la naturaleza de la misma. Los grupos funcionales generados pueden cambiar el carácter hidrofóbico o la carga de la superficie. A continuación se detallan los métodos usados en esta tesis para la funcionalización de las superficies empleadas:

Quimisorción de tioles:

La formación de monocapas autoensabladas (SAM) de tioles es uno de los métodos más sencillos para la funcionalización de superficies metálicas. Este ordenamiento molecular se produce en la interfase que existe entre una superficie sólida y una sustancia activa en disolución. La quimisorción de tioles sobre el oro se produce de manera espontánea, en la cual se produce la

eliminación de H_2 mediante la reacción mostrada en la Figura 1.1, (Gooding, J. J. y col., 2003).

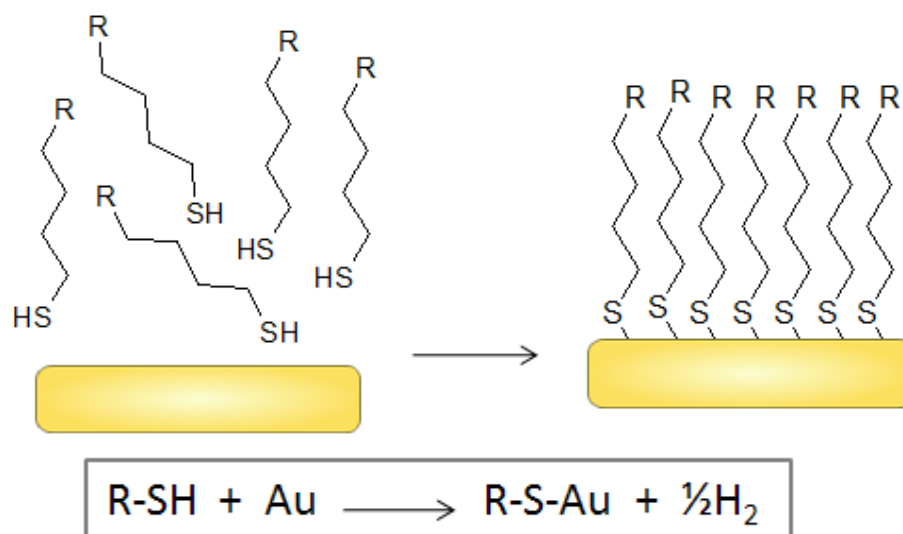


Figura 1.1. Representación de la formación de SAM de tioles alifáticos sobre oro.

Como soportes sólidos se han estudiado, además del oro, otras superficies metálicas, tales como plata (Ihs, A. y col., 1994), platino (Shimazu, K. y col., 1994), cobre (Laibinis, P. E. y col., 1992) y hierro (Stratmann, M., 1990).

Además de los compuestos tiolados, se ha demostrado que otros tipos de compuestos sulfurados presentan la propiedad de autoensamblarse en superficies metálicas. Entre ellos se encuentran las aminas primarias, los tiocarbamatos y las tioureas (Edwards, T. R. G. y col., 1989) (Cooper, J. M. y col., 1993). Las monocapas de tioles muestran, en general, un grado óptimo de organización, compactación y estabilidad como resultado de los enlaces Au-S. A pesar de esto, se ha encontrado que en las monocapas pueden existir ciertos defectos de auto-organización, especialmente cuando la cadena carbonada es muy corta y presenta algún grupo funcional cargado (Troughton, E. B. y col., 1988).

El proceso de quimisorción en una superficie sólida está influenciado, entre otros factores, por la estructura química del receptor y puede ser descrita mediante dos etapas fundamentales:

1_ Proceso físico de adsorción, que es una etapa bastante rápida.

2_Formación de enlace y orientación, que conlleva a la formación de la monocapa, y que suele ser una etapa más lenta.

Las SAM de tioles no son estables a potenciales negativos debido a que sufren la desorción del tiol de la superficie, según la siguiente reacción:



A partir de un potencial suficientemente negativo se rompe el enlace formado entre el azufre y el oro, y se libera el tiol a la disolución (Walczak, M. M. y col., 1991).

Existen diferentes factores que afectan en la formación de la monocapa, como son:

- **Disolvente:** El tiol tiene que desplazar las moléculas de disolvente que están en contacto con la superficie metálica para la formación de la SAM. El disolvente más empleado suele ser el etanol ya que es capaz de disolver a la gran mayoría de los tioles, es barato, se encuentra en un alto grado de pureza y presenta baja toxicidad.
- **Temperatura:** Temperaturas inferiores a 25 °C pueden favorecer la formación de la monocapa y disminuir la aparición de defectos, mientras que temperaturas superiores pueden favorecer la desorción de la monocapa. El efecto de la temperatura es determinante durante los primeros minutos de la formación de la monocapa, cuando tiene lugar la mayor parte de la adsorción del tiol.
- **Concentración y tiempo de reacción:** Estos dos factores se encuentran interrelacionados, a menor concentración de tioles se requiere mayor tiempo de inmersión. El grado de recubrimiento de una SAM compacta es de $4,5 \times 10^{14}$ moléculas/cm² (Love, J. C. y col., 2005). A partir de concentraciones de tiol 1 mM el recubrimiento obtenido es reproducible. Los tiempos de incubación más empleados suelen estar entre 12 y 18 horas, ya que suelen bastar para obtener monocapas altamente organizadas. Aunque experimentos realizados sugieren que un tiempo de inmersión de 7-10 días disminuye el número de defectos en la monocapa (Love, J. C. y col., 2005).

- Limpieza de la superficie: Aunque los tioles son capaces de desplazar impurezas adsorbidas sobre la superficie del sustrato, éstas dificultan el proceso de adsorción y la ordenación de la monocapa, por lo que tratamientos fuertemente oxidativos para limpiar la superficie pueden mejorar la reproducibilidad en la formación de la SAM (Love, J. C. y col., 2005).

Modificación con sales de diazonio aromáticas:

Esta modificación permite la formación de monocapas o multicapas de compuestos aromáticos sobre la superficie de los electrodos, y ha sido ampliamente aplicada a lo largo de esta tesis. Delamar y cols. modificaron por primera vez en los años 90 electrodos de carbono con derivados aromáticos de sales de diazonio (Delamar, M. y col., 1992). Para ello redujeron electroquímicamente la sal de diazonio, formándose un enlace covalente C-C con el electrodo (Allongue, P. y col., 1997). La modificación electroquímica es un método sencillo y rápido que permite modificar la superficie con una gran variedad de monocapas mediante unión covalente, lo que ofrece gran estabilidad. También permite controlar la formación de una monocapa o multicapas mediante el potencial redox y el tiempo de aplicación (Downard, A. J., 2000). Superficies de carbono también se pueden modificar con sales de diazonio espontáneamente, sin la necesidad de aplicar un potencial (Adenier, A. y col., 2005).

Algunas sales de diazonio aromáticas pueden adquirirse comercialmente, en caso de no estar disponibles se pueden preparar *in situ* mediante la reducción de amina aromática primaria a azo. La aplicación de un potencial eléctrico reductivo provoca que del grupo azo se desprenda como una molécula de N₂ y se genere un radical arilo, que posteriormente reaccionará con la superficie del electrodo formando un enlace C-C (Figura 1.2).

El recubrimiento teórico para una monocapa compacta de anillos aromáticos es de $1,35 \times 10^{-9}$ mol/cm² (Pinson, J. y col., 2005), pero se ha demostrado mediante técnicas como XPS, espectroscopía Raman o AFM, que los recubrimientos experimentales obtenidos son mayores. Esto es debido a la formación de multicapas, ya que los radicales arilos generados electroquímicamente pueden reaccionar con los arilos ya anclados a la

superficie a través de sustituciones nucleófilas (Brooksby, P. A. y col., 2004), como se muestra en la Figura 1.2.

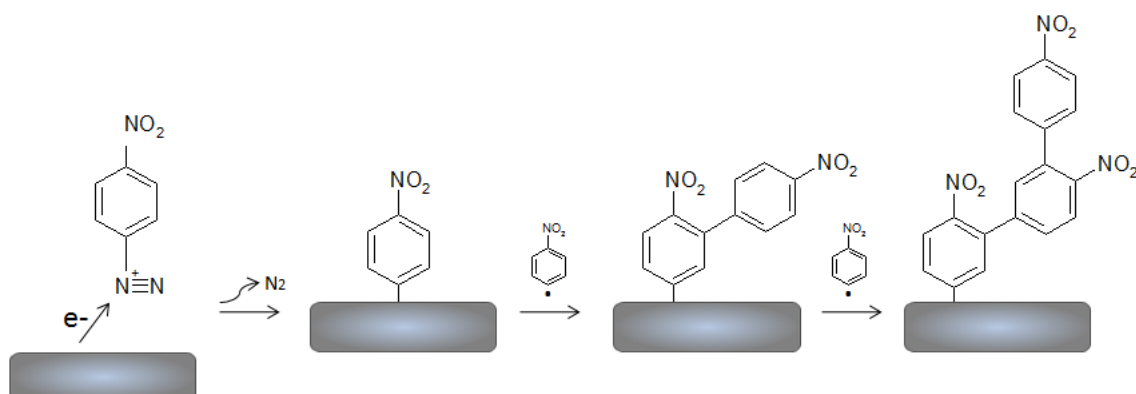


Figura 1.2. Modificación de un electrodo de carbono con sal de diazonio 4-nitrofenilo.

Superficies metálicas planas, como el oro, e incluso superficies nanoestructuradas como las nanopartículas de oro, también pueden ser modificadas mediante este método (Liu, G. y col., 2007) (Lyskawa, J. y col., 2006), generando enlaces covalentes Au-C (Laurentius, L. y col., 2011). Las superficies de oro también se pueden modificar espontáneamente, sin la necesidad de aplicar un potencial (Podvorica, F. I. y col., 2009). Estas películas orgánicas generadas sobre el oro tienen mayor estabilidad mecánica y térmica que las conseguidas mediante formación de SAM de tioles (Kullapere, M. y col., 2010). Además, resisten tiempos prolongados de sonicación y de reflujo en acetonitrilo, mientras que las monocapas formadas por tioles no son tan estables en esas condiciones. Esto demuestra la estabilidad que presentan los derivados de diazonio modificados sobre el oro en comparación con las monocapas análogas de tioles (Shewchuk, D. M. y col., 2009). Sin embargo, se obtienen capas tres veces más gruesas que las formadas por su derivado tiol análogo (Shewchuk, D. M. y col., 2009). Por reducción de sales de diazonio se pueden obtener superficies de oro modificadas con capas más finas disminuyendo el número de ciclos durante la electrodeposición (Harper, J. C. y col., 2009).

1.3. Inmovilización de enzimas

Los procesos industriales y de laboratorio catalizados por enzimas son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos, como una alta actividad catalítica, una gran especificidad de sustrato (incluso estereoselectividad y regioespecificidad) y son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica. A pesar de estas claras ventajas, el empleo de enzimas conlleva una serie de problemas. Al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar. Con la inmovilización de las enzimas sobre soportes se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea factible (Arroyo, M., 1998) (Torres-Salas, P. y col., 2011).

La inmovilización de enzimas es un proceso que en los años setenta se definió como aquel en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente (Wingard, L.B., 1972).

Posteriormente, esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte (Taylor, R.F. y col., 1991) (Gordon F. B., 1997).

Los métodos de inmovilización de enzimas son muy diversos y se pueden clasificar del siguiente modo:

Métodos de inmovilización de enzimas por interacción química:

- Adsorción: Mediante este método de inmovilización la enzima se une a un soporte, funcionalizado o no, a través de interacciones iónicas, fuerzas de Van de Waals y/o por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en la adsorción son: a) El pH del medio, ya que controla el número y la naturaleza de las cargas presentes en la superficie de la proteína y la del soporte; b) La fuerza iónica, la cual al

aumentar produce un efecto de apantallamiento entre el soporte y la enzima que bien facilita su desorción o dificulta su adsorción; c) La rugosidad de la superficie y el tipo y tamaño de sus poros, que deben ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima.

Este método se caracteriza por su bajo coste y preparación sencilla, pero la unión entre el soporte y la enzima es débil, lo que lleva a uniones poco estables y poco eficaces.

- Unión covalente: La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con grupos funcionales de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y los ácidos aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrofóbico, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente.

Este método presenta una serie de ventajas: los derivados son sencillos de manipular, la carga de enzima sobre el soporte permanece constante después de la inmovilización, los derivados pueden utilizarse en diferentes tipos de reactores (en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado, tanque agitado, etc.) y una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria. En cambio, la inmovilización mediante enlace covalente también presenta una serie de inconvenientes. Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte. Un número elevado de uniones puede afectar a la estructura terciaria de la enzima, pudiendo perder parte de su actividad y conducir a derivados inactivos.

La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

- Reticulado: También denominado entrecruzamiento o *cross-linking*, es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de muchas enzimas (Alonso, N.y col., 2005) (Betancor, L.y col., 2005) (López-Gallego, F.y col., 2005). El método del reticulado consiste en el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre diferentes moléculas de enzima. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

Actualmente el método más novedoso de cross-linking consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído (Cross-Linked Enzyme Crystals o CLECs). El aumento de estabilidad se basa en la obtención de un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína. De esta manera la propia enzima actúa como soporte, y su estructura terciaria está estabilizada por las uniones covalentes intermoleculares.

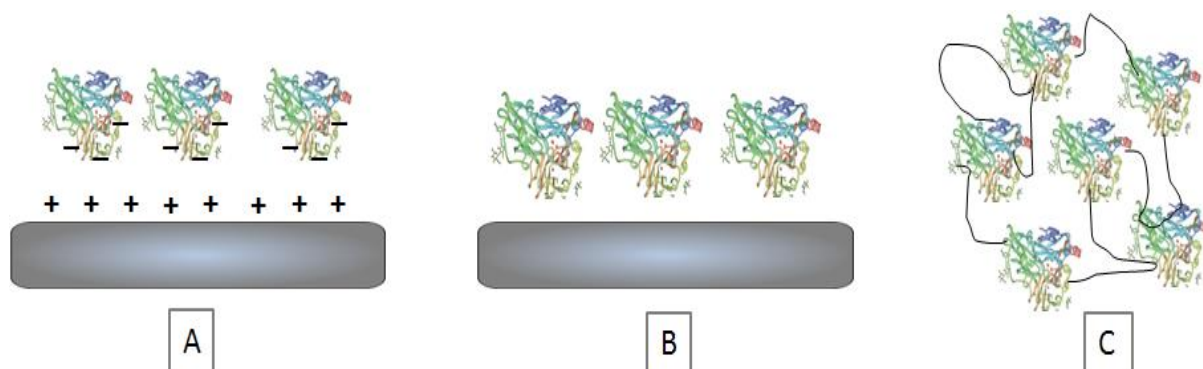


Figura 1.3. Inmovilización de enzimas mediante interacciones químicas: A) Adsorción sobre soporte mediante fuerzas iónicas. B) Enlace covalente al soporte. C) Entrecruzamiento de moléculas de enzimas.

Métodos de inmovilización de enzimas por interacciones físicas:

- **Atrapamiento:** Se define como la retención física de enzimas en matrices sólidas y porosas como poliacrilamida, colágeno o alginato entre otras. Se diferencia de la adsorción y del enlace covalente en que las enzimas están sueltas en una disolución, pero su movimiento está restringido por la estructura de rejilla que presenta el gel.
- **Encapsulación:** Es un sistema similar al atrapamiento pero con las moléculas de enzima en una disolución restringida en espacio por una membrana semipermeable a pequeños sustratos y productos.

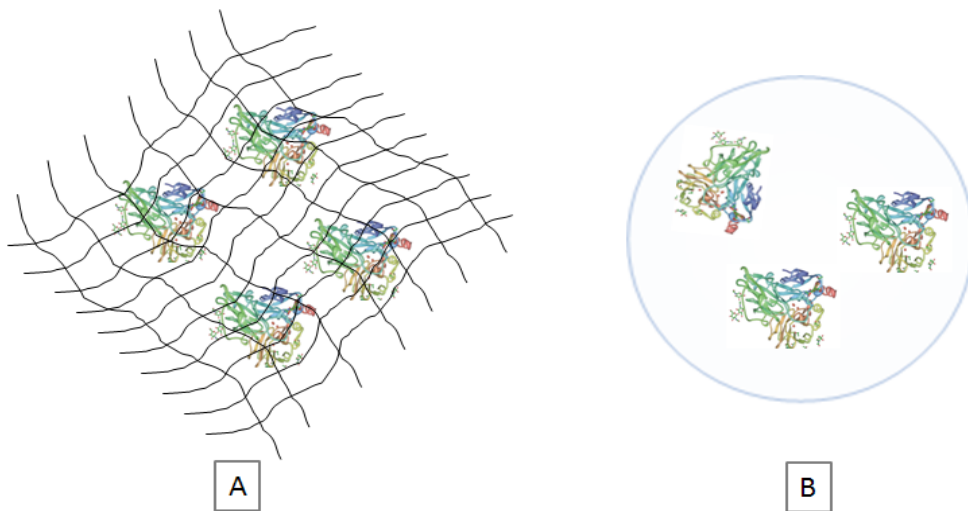


Figura 1.4. Inmovilización de enzimas mediante interacciones físicas: A) Atrapamiento de moléculas de enzima en una matriz sólida y porosa. B) Encapsulación de enzimas por membrana.

Generalmente, se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización, que se debe principalmente a una estabilización conformacional de la enzima debido a la existencia de uniones enzima-soporte. La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Se evita de este modo la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio. Este tipo de ventajas

se obtienen únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente.

A lo largo de esta tesis se van a desarrollar diferentes estrategias con las que se pretende inmovilizar enzimas covalentemente sobre diferentes tipos de superficies planas para posteriormente escalarlo a superficies nanoestructuradas.

Los electrodos nanoestructurados ofrecen una gran elevada área superficial pudiendo permitir inmovilizar una gran cantidad de enzima, manteniendo un tamaño muy reducido del electrodo y una transducción de la señal elevada (Katz, E.y col., 2004). Un electrodo nanoestructurado, en el sentido estricto, no solo se refiere a un electrodo que contenga nanoelementos conductores, como nanotubos de carbono o nanopartículas de oro, sino que además haya un control en la nanoescala de la organización estructural y la composición química del electrodo.

Los nanotubos de carbono (CNT) presentan extraordinarias propiedades estructurales, mecánicas, químicas y eléctricas, además de tener compatibilidad con sustancias biológicas (Feng, W.y col., 2011). Pueden estar constituidos por una sola pared (SWCNT) o por más paredes (MWCNT). Los CNT con diámetros entre 1 nm para los SWCNT y 10 nm para MWCNT son ideales para situarse próximos a la región cercana al centro activo de la enzima (Holzinger, M.y col., 2012).

Por otro lado, las nanopartículas de oro también pueden aportar ventajas a los electrodos en el análisis electroquímico, como son la mejora en el transporte de carga y el aumento del área superficial. El empleo de nanopartículas de oro mantiene las mismas propiedades químicas de reactividad que las superficies continuas de oro, pero al mismo tiempo ofrecen una mayor biocompatibilidad. Esto se debe a que al reducir las dimensiones del oro también se minimizan las interacciones con el material proteico, permitiendo una quimisorción con menor influencia en la estructura del material proteico (Yáñez-Sedeño, P.y col., 2005).

Una de las nuevas tendencias es la utilización de materiales híbridos como son los nanomateriales de carbono junto con las nanopartículas de oro con el fin de desarrollar transductores que combinen las ventajas de una y otra nanoestructura (Naruse, J.y col., 2011) (Li, L.y col., 2012). Todos estos tipos de

materiales se emplean en el desarrollo de bioelectrodos, ya que permiten una adecuada comunicación electrónica entre la enzima redox con el electrodo (Feng, W.y col., 2011).

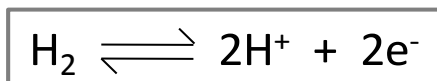
1.4. Enzimas

En esta tesis se ha estudiado la inmovilización sobre electrodos (planos y nanoestructurados) y las propiedades electrocatalíticas de dos metaloenzimas redox diferentes: hidrogenasas y lacasas.

1.4.1. Hidrogenasas

Las hidrogenasas son enzimas que catalizan la transformación de una molécula de hidrógeno en dos protones y dos electrones, que van a parar a un aceptor. En la mayoría de los casos la hidrogenasa es también capaz de llevar a cabo la reacción inversa, produciendo una molécula de hidrógeno a partir de dos protones y dos electrones procedientes de un sustrato. La mayor parte de las hidrogenasas conocidas proceden de microorganismos anaerobios y por ello presentan sensibilidad al O₂, aunque también se conocen hidrogenasas menos sensibles a la inhibición por monóxido de carbono y de O₂ (Vincent, K. A.y col., 2005a) (Vincent, K. A.y col., 2005b) (Parkin, A.y col., 2008) (Marques, M. C.y col., 2010).

Las hidrogenasas contienen en su centro activo un complejo bimetalico de Fe/Fe o Fe/Ni que cataliza la oxidación o producción de H₂ según la reacción:



Estructura:

Las hidrogenasas se pueden clasificar según la composición del centro activo como hidrogenasas de [NiFe] o de [FeFe]. En el centro activo de todas ellas el átomo o los átomos de Fe se encuentran coordinados por ligandos inorgánicos, CO y CN⁻, que son detectables por FTIR (De Lacey, A. L.y col., 1997). El átomo de níquel en las hidrogenasas estándares de [NiFe] se encuentra coordinado por los S de dos cisteínas puente, también coordinadas

al átomo de Fe, y por otras dos cisteínas adicionales unidas de forma terminal. El centro activo presenta también otro ligando puente entre los átomos de Fe y Ni, que es el sustrato en la forma activa de la hidrogenasa, o cualquiera de los inhibidores de la enzima (oxígeno o monóxido de carbono) en las formas inactivas (Figura 1.5) (Fontecilla-Camps, J. C. y col., 2007).

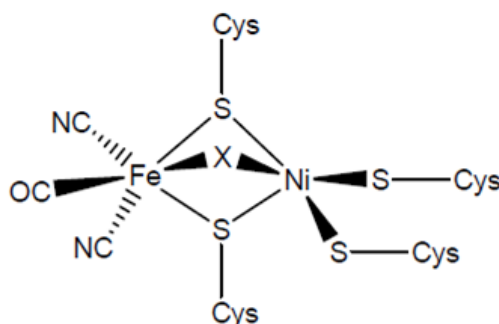


Figura 1.5. Representación esquemática del centro activo de una hidrogenasa [NiFe]. El átomo X puede ser O₂ o CO.

Las hidrogenasas [NiFe] son el grupo de hidrogenasas más abundante y presentan generalmente dos subunidades. La subunidad catalítica contiene el centro activo y es de mayor tamaño, y la subunidad pequeña contiene las agrupaciones sulfoféricas que se encargan de transferir los electrones entre el centro activo y la superficie de la hidrogenasa (Fontecilla-Camps, J. C. y col., 2007).

Las hidrogenasas [NiFeSe] son un subgrupo de la gran familia de las hidrogenasas [NiFe], en las cuales un ligando selenocisteína se encuentra coordinado al Ni en posición terminal en lugar de un ligando cisteína. Esta diferencia estructural en el centro activo de las hidrogenasas [NiFeSe] afecta a las propiedades espectroscópicas y catalíticas de la enzima. Los estados oxidados de las hidrogenasas [NiFe] tienen Ni³⁺ paramagnético, mientras que en las hidrogenasas [NiFeSe] oxidadas el Ni no es detectable por Resonancia Paramagnética de Electrón (EPR), y por tanto se encuentra en el estado de oxidación Ni²⁺. Bajo condiciones reductivas las hidrogenasas de [NiFeSe] son activadas rápidamente, mientras que las hidrogenasas [NiFe] requieren un proceso lento de activación. Además, catalizan el doble intercambio isotópico de D₂/H⁺ más rápido que el intercambio simple, en comparación con las hidrogenasas [NiFe] (Fauque, G. D. y col., 1987) (Wang, C. P. y col., 1992)

(Vignais, P. M. y col., 2002). Por último, las hidrogenasas [NiFeSe] presentan actividad de producción de H_2 más alta que la de oxidación de H_2 , al contrario que las hidrogenasas [NiFe] (Eidsness, M. K. y col., 1989).

Aunque las hidrogenasas de [NiFeSe] tienen notables ventajas catalíticas sobre las estándar de [NiFe], solamente han sido aisladas un número reducido de hidrogenasas de [NiFeSe] de microorganismos tales como *Dm. baculatum* (Garcin, E. y col., 1999), *D. vulgaris* Hildenborough (DvH) (Valente, F. y col., 2005), y han sido poco caracterizadas en comparación con las de [NiFe].

Debido a que en esta tesis se ha trabajado con la hidrogenasa [NiFeSe] de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Hasa DvH), se describe esta enzima en particular:

La hidrogenasa [NiFeSe] es la hidrogenasa mayoritaria en las membranas de la bacteria *D. v. H.* Se encuentra en la célula en dos conformaciones: la forma de membrana [NiFeSe]_{membrana} mayoritaria y la forma soluble [NiFeSe]_{soluble}, que es la minoritaria (Valente, F. y col., 2005). La hidrogenasa mayoritaria [NiFeSe]_{membrana} presenta una cadena hidrofóbica, formada por tres ácidos grasos que esterifican un glicerol en la región N-terminal de la subunidad grande, a través del cual se asocia a la membrana citoplasmática (Valente, F. M. y col., 2007). La integridad de la cadena hidrofóbica de la hidrogenasa requiere la presencia de detergente o fosfolípidos. La forma soluble de la enzima no contiene esa cadena hidrofóbica y presenta actividades considerablemente más bajas que la forma de membrana.

Se ha determinado por difracción de rayos X la estructura cristalina de la forma soluble de la hidrogenasa [NiFeSe] aislada aeróbicamente (Marques, M. C. y col., 2010). La Hasa DvH está compuesta por dos subunidades, con un peso molecular de 63 y 35 KDa para cada una de ellas respectivamente (Valente, F. y col., 2005). En la subunidad pequeña se encuentran tres agrupaciones sulfoféricas o “cluster” $[4Fe4S]^{2+/1+}$, llamadas proximal, medio y distal (Figura 1.6). Se encuentran alineadas entre sí y separadas unos 12 Å, para permitir el transporte de electrones intramolecular (Page, C. C. y col., 1999). El centro activo se encuentra enterrado en la subunidad grande, y al contrario que las hidrogenasas [NiFe] no contienen átomos de oxígeno

punteando los átomos de Ni y Fe, haciendo que estos átomos se encuentren más próximos entre sí (2,5 Å) que en las hidrogenasas estándar de [NiFe] (2,7-2,9 Å).

Se han observado tres confórmers en el centro activo. El confórmer I es el predominante mientras que el II y III son minoritarios. El confórmer II podría corresponder con el estado enzimático intermedio entre el confórmer I y III, como se encuentran representados en la Figura 1.6.

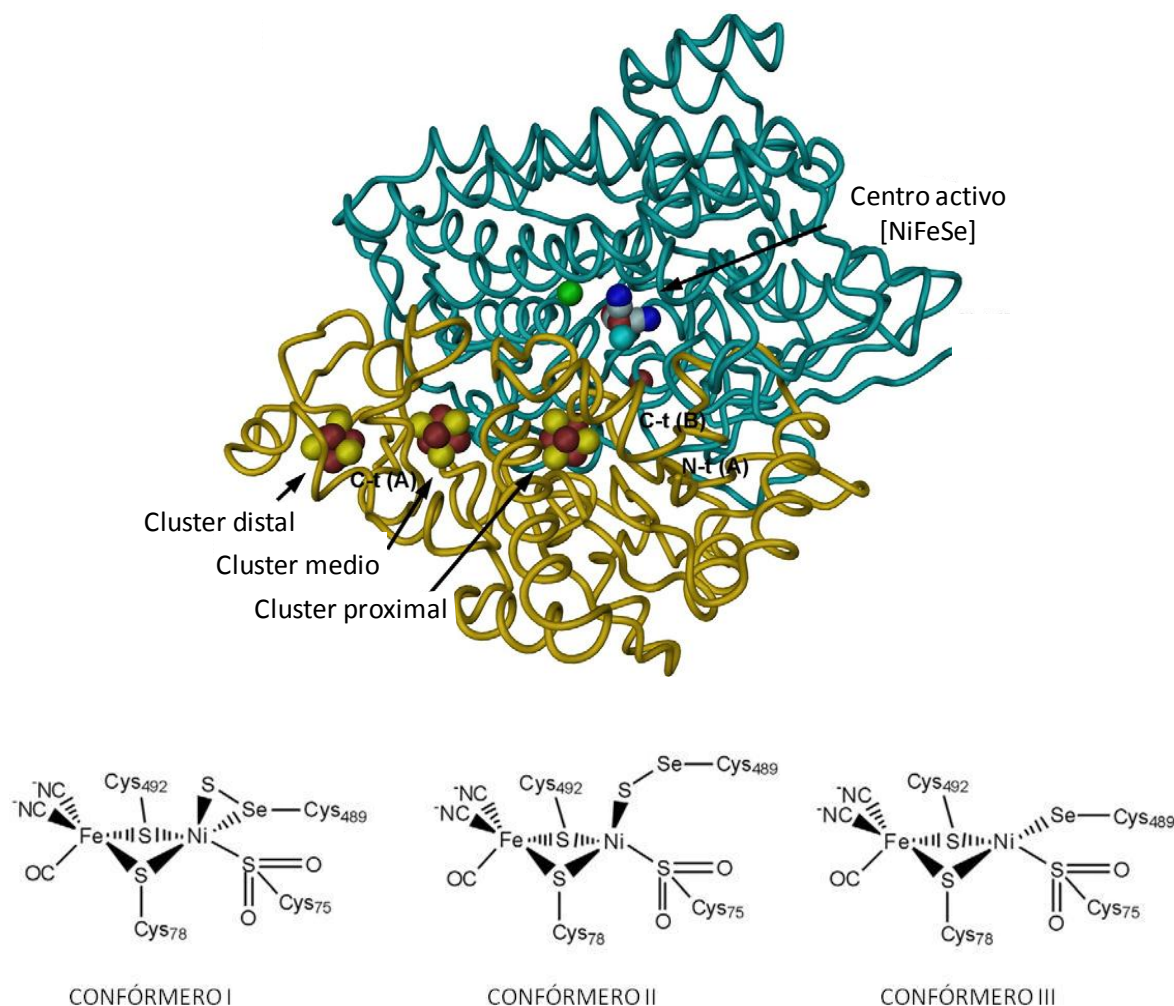


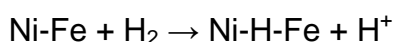
Figura 1.6. Estructura de la hidrogenasa *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. En verde se representa la subunidad grande, donde se encuentra el centro activo y en marrón la subunidad pequeña con los tres cluster. Representación esquemática de los confórmers que constituyen el centro activo.

Las diferencias entre ellos predominan en las proximidades de la selenocisteína, donde el confórmer I y II contienen un S^{2-} extra coordinado al Ni y formando un enlace covalente con el Se. La cisteína que se encuentra

coordinada al Ni, se encuentra doblemente oxidada, formando un sulfinato, en los tres confórmers.

Mecanismo catalítico:

El ciclo catalítico para el caso de la oxidación de H₂ lo describen De Lacey y cols. de la siguiente manera para las hidrogenasas de [Ni-Fe] (De Lacey, A. L. y cols., 2007a). En primer lugar se produce la difusión de las moléculas de H₂ desde la superficie de la enzima al centro activo. Se han descubierto una serie de canales por donde el H₂ puede difundir a través de su estructura hasta el centro activo (Montet, Y. y cols., 1997). Se produce la ruptura heterolítica del H₂ después de unirse al centro activo, donde un hidruro se queda unido al centro bimetálico, actuando como puente entre el Ni y el Fe:



Posteriormente se produce la oxidación del hidruro a protón. Este paso requiere un aceptor que pueda tomar los dos electrones del estado de transición reducido. El Ni³⁺ toma los electrones para pasar a Ni²⁺.



La transferencia de H⁺ desde el centro activo hasta el medio acuoso tiene lugar a través de distintos ligandos cisteína, histidina y glutamatos. La transferencia de electrones desde el centro activo hasta el cluster distal, tiene lugar a través de las 3 agrupaciones sulfoféricas, que conducen los electrones a la superficie de la enzima, donde una segunda proteína se puede acoplar y tomar los electrones. Las cortas distancias entre los clusters (1,2-1,4 nm) son cruciales para una rápida transferencia electrónica intramolecular (Page, C. C. y cols., 1999) (Rousset, M. y cols., 1998). La transferencia electrónica intermolecular tiene lugar entre el cluster distal, el más cercano a la superficie de la hidrogenasa, y el aceptor de electrones, en el caso de la hidrogenasa de DvH, el aceptor es el citocromo c3 (Valente, F. y cols., 2005). La zona que rodea el cluster distal es la que más variabilidad presenta si se compara con otras hidrogenasas. La distribución de cargas de la enzima, Hasa DvH es similar a la

hidrogenasa *D. Gigas* (Rudiger, O.y col., 2005) donde se puede observar una zona de residuos glutámicos, rodeando el cluster distal (Volbeda, A.y col., 1996) que se encargará de atraer y orientar al citocromo c3, a través de las cargas positivas generadas por las lisinas que rodean el grupo hemo (Pereira, I. A. C.y col., 1998) (Morelli, X.y col., 2000).

1.4.2. Lacasas

Las lacasas pertenecen a la clase de enzimas llamadas oxidasas multicobre (MCO), las cuales contienen varios centros redox de cobre y catalizan la reducción de O₂ molecular a agua por varios compuestos orgánicos como orto y para-difenoles, aminofenoles, polifenoles y ligninas entre otros; pudiendo también reducir algunos compuestos inorgánicos (Yaropolov, A. I.y col., 1994) (Solomon, E. I.y col., 1996). Las lacasas se pueden clasificar de modo general en dos grupos según su origen: las producidas por plantas y las producidas por hongos. Sin embargo, lacasas que son capaces de oxidar difenoles han sido encontradas también en bacterias (Givaudan, A.y col., 1993) (Martins, L. O.y col., 2002) e insectos (Barrett, F. M.y col., 1981).

La mayoría de las lacasas son proteínas extracelulares, pero algún tipo de hongos blancos producen lacasas tanto extracelulares como intracelulares (Blaich, R.y col., 1975). Esta localización de la lacasa parece estar asociada con sus funciones fisiológicas. Las lacasas de hongo intracelulares pueden estar envueltas en la transformación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular. Las lacasas localizadas en la pared celular y esporas pueden estar involucradas en la síntesis de melaninas y otras sustancias que protegen a la pared celular (Eggert, C.y col., 1995) (Galhaup, C.y col., 2001).

Estructura:

La estructura tridimensional se ha descrito para varias lacasas (Piontek, K.y col., 2002) (Lyashenko, A. V.y col., 2006a), entre ellas la lacasa de *Trametes hirsuta*, estudiada en esta tesis doctoral (Polyakov, K. M.y col., 2009). Las diferencias entre unas y otras se centran principalmente en la zona denominada bolsillo de unión del sustrato (Morozova, O. V.y col., 2007). Las moléculas de lacasa son monoméricas y presentan tres dominios globulares

conectados entre sí. Contienen cuatro iones cobre, repartidos en tres centros. El centro T1 de la lacasa contiene un ión de Cu y está localizado en el tercer dominio, mientras que los centros T2 y T3 están situados entre el primer y el tercer dominio y comparten aminoácidos entre ellos, formando el agrupamiento trinuclear T2/T3. Hay un canal que permite el acceso del sustrato O₂ al centro T3 y otro que comunica el centro T2 con el exterior para eliminar la molécula de H₂O formada durante el ciclo catalítico (Lyashenko, A. V.y col., 2006b) (Piontek, K.y col., 2002). Los aminoácidos del segundo y tercer dominio están involucrados en la formación del bolsillo al que se une el sustrato.

La lacasa de *Trametes hirsuta* (LTh) es una glicoproteína globular de hongo de dimensiones (65 × 55 × 45) Å, y que presenta las siguientes características: peso molecular de 70 kD, 12 % de carbohidratos en su estructura, punto isoeléctrico de 4,2, tiempo de vida media de inactivación a 50 °C de 65 h (Shleev, S. V.y col., 2004).

Estructura del centro activo de las lacasas:

Las propiedades catalíticas de las lacasas se deben a los tres centros de cobre. El centro T1 se encuentra a 6 Å de la superficie de la enzima. La distancia entre los centros T2 y T3 es de 4 Å y el centro T1 se encuentra separado de ellos 12 Å (Enguita, F. J.y col., 2003) (Garavaglia, S.y col., 2004) (Palmer, A. E.y col., 2001).

Los iones de cobre del centro activo se encuentran clasificados según sus propiedades espectroscópicas (Malmstrom, B. G., 1982) (Reinhammar, B. R.y col., 1971) (Solomon, E. I.y col., 1996). El centro T1 de lacasa proporciona color azul a las disoluciones de enzima y se caracteriza por presentar una banda pronunciada de absorción a 600 nm (ϵ 5000 M⁻¹ cm⁻¹) y por un estrecho desdoblamiento en el espectro de EPR ($g_{||} = 2,30$, $A_{||} = (40-95) \times 10^{-4}$ cm⁻¹) cuando está en el estado oxidado Cu²⁺ (Solomon, E. I.y col., 1992) (Quintanar, L.y col., 2005). Los ligandos del centro T1 son dos histidinas a las que se une a través del nitrógeno y una cisteína que se une a través del grupo sulfuro, las cuales forman una estructura trigonal. En algunas lacasas hay un cuarto ligando en posición axial y a mayor distancia, que generalmente es metionina, leucina o fenilalanina.

El centro T2, también mononuclear, no presenta espectro visible de absorción, pero sí un estrecho desdoblamiento en el espectro de EPR ($g_{\parallel} = 2,24$, $A_{\parallel} = (140-200) \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$), el cual es típico de los iones Cu^{2+} tetragonales (Solomon, E. I. y col., 1992) (Quintanar, L. y col., 2005). Los ligandos que coordinan el Cu T2 son un hidroxilo y dos histidinas a través del nitrógeno. La eliminación selectiva del centro T2 de la enzima implica la pérdida de la actividad catalítica (Malkin, R. y col., 1969).

El centro T3 de las lacasas contiene dos iones cobre, unidos a través de un puente por un hidroxilo. Cada cobre está coordinado por otros tres ligandos de histidina. Este sitio puede ser identificado por la presencia de un hombro a 330 nm en la región del UV (Solomon, E. I. y col., 1994).

Potencial redox del centro T1:

El valor del potencial del centro T1 de cobre permite clasificar a las lacasas en enzimas de bajo, medio y alto potencial redox (Eggert, C. y col., 1998) (Christenson, A. y col., 2004) (Shleev, S. y col., 2005b). Las lacasas de alto potencial son aquellas cuyo centro T1 tiene un potencial entre 700-800 mV vs NHE, como por ejemplo las de *Trametes hirsuta*, *T. versicolor*, *T. villosa*, todas ellas con potencial próximo a 780 mV vs NHE (Reinhammar, B. R. M., 1972) (Xu, F. y col., 1996b) (Koroleva, O. V. y col., 2001). Las lacasas de bajo potencial tienen un centro T1 de 430-650 mV vs NHE (Reinhammar, B. R. M., 1972).

El potencial del centro T1 es conocido para muchas lacasas, sin embargo el del centro T2/T3 sólo para algunas. El potencial del centro T1 para la lacasa *Th* es 780 mV vs NHE (Shleev, S. V. y col., 2004) y el potencial del centro T2/T3 400 mV vs NHE (Shleev, S. y col., 2006a).

El valor del potencial redox del centro T1 se pensó en un principio que dependía de los ligandos del cobre y de los residuos aminoácidos que constituían el bolsillo de unión de sustrato (Kojima, Y. y col., 1990) (Xu, F. y col., 1998). Las lacasas de alto potencial tienen un residuo de fenilalanina como ligando axial del centro T1, mientras que las lacasas de medio y bajo potencial poseen un residuo leucina o metionina. Sin embargo, resultados de mutagénesis dirigida realizadas para otras lacasas muestran que los ligandos del entorno del centro de cobre T1 no presentan una fuerte influencia en su

potencial (Xu, F.y col., 1998) (Xu, F.y col., 1999). Así, estudios realizados con mutantes en el ligando axial del centro T1 no revelan cambios significativos en el potencial del centro T1. Sin embargo, se ha concluido que un aumento en la distancia de enlace cobre-nitrógeno sí afecta al valor del potencial del centro T1, debido a una disminución de la contribución del par electrónico libre del nitrógeno (Piontek, K.y col., 2002).

Propiedades y mecanismos catalíticos:

El centro T1 de la lacasa es el primer aceptor de electrones procedentes de la reducción de los sustratos. Las lacasas solo pueden oxidar directamente compuestos cuyo potencial redox no sea más alto que el potencial redox del centro T1 de cobre de la enzima (Xu, F., 1997). Por lo tanto, el potencial del centro T1 determina la eficacia catalítica en la oxidación de los sustratos, por lo que las lacasas de alto potencial resultan ser muy interesantes para aplicaciones biotecnológicas.

El centro T1 de la lacasa es capaz de aceptar electrones del sustrato reducido que serán transferidos al centro T2/T3 donde el O₂ molecular será reducido a agua. En la Figura 1.7, se muestra el proceso de reducción de O₂ a agua catalizado por la lacasa, donde se ven involucrados cuatro electrones (Shleev, S.y col., 2006b).

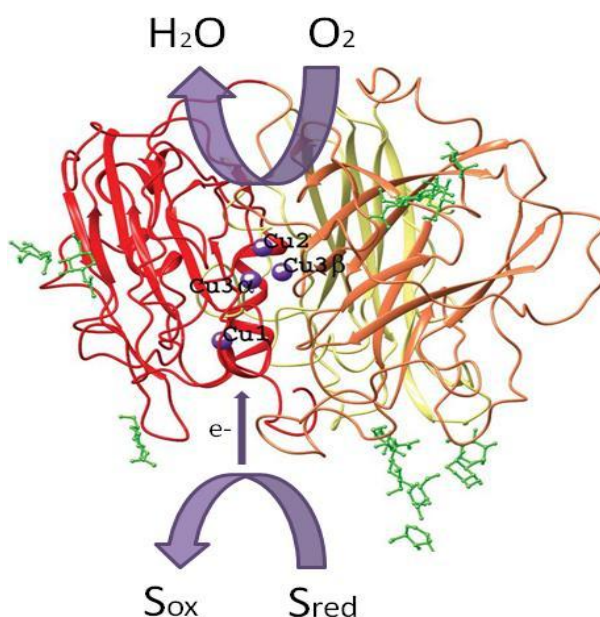


Figura 1.7. Reacción catalítica de lacasa *Th*.

El sustrato se oxida reduciendo el centro de Cu T1, que transmitirá los electrones al cluster T2/T3, a través de los enlaces covalentes de la cadena cistamina-2 histidina. A continuación una molécula de oxígeno reaccionará con el centro T2/T3 de lacasa, oxidando los cobres a Cu^{2+} . Un puente peroxo coordinado entre los cobres del centro se forma como intermedio. Por último, se desprenderá una molécula de agua del centro T2/T3 permitiendo recuperar el estado redox inicial de los centros de cobre. El ciclo catalítico completo conlleva la reducción total del O_2 formando dos moléculas de agua, para lo cual se oxidan cuatro moléculas de sustrato monoelectrónico (Solomon, E. I. y col., 1996).

Inhibidores de las lacasas:

En presencia de una serie de compuestos como hidroxilos, cianuros, azidas, haluros, entre otros, las lacasas son inhibidas (Baldrian, P., 2006).

A lo largo de esta tesis se ha estudiado el efecto que los haluros, como el ión cloruro y fluoruro provocan en la actividad catalítica de la lacasa *Th*. El comportamiento que presentan los haluros depende del tipo de ión. Los fluoruros se unen al centro T2/T3 de las lacasas de tal manera que se paraliza la transferencia electrónica intramolecular desde el centro T1 hasta el T2/T3 causando que tanto la corriente de reducción de O_2 directa como mediada se vea afectada en presencia de fluoruros en el caso de una lacasa inmovilizada sobre un electrodo (Xu, F. y col., 1998) (Naki, A. y col., 1981). Sin embargo, los cloruros bloquean el acceso al centro T1, donde se asocia el sustrato donador de electrones, como por ejemplo el ABTS. Debido a que el cloruro presenta mayor tamaño, por impedimento estérico no puede acceder tanto al interior de la estructura de la lacasa y no impide la transferencia electrónica intramolecular, permitiendo la reducción catalítica directa de O_2 pero no la mediada (Vaz-Dominguez, C. y col., 2008).

1.5. Transferencia electrónica enzimática

El proceso de transferencia electrónica directa (TED) se refiere a aquellas enzimas redox que son capaces de transferir directamente los

electrones desde su centro redox al electrodo. La velocidad de transferencia electrónica está relacionada con la distancia aproximada entre el dador y el aceptor, resultando imposible para distancias superiores a 2 nm (Marcus, R. A. y col., 1985). Por lo que la TED solamente tendrá lugar cuando un electrodo se encuentre a menos de 2 nm de distancia del centro redox de la enzima. Además, la enzima debe tener su centro activo suficientemente expuesto para permitir que la TED tenga lugar, además de una orientación correcta hacia la superficie del electrodo para que la distancia sea la adecuada para la TED (Figura 1.8).

Una alternativa a la TED es el empleo de mediadores redox, moléculas electroactivas estables que pueden ser usadas como transportadores de electrones entre la enzima y el electrodo, como se muestra en la Figura 1.8. Este proceso se denomina transferencia electrónica mediada (TM). El potencial redox de la enzima y el del mediador deben ser cercanos, con una diferencia aproximada de 50 mV, para que la TM sea eficaz (Heller, A., 2005).

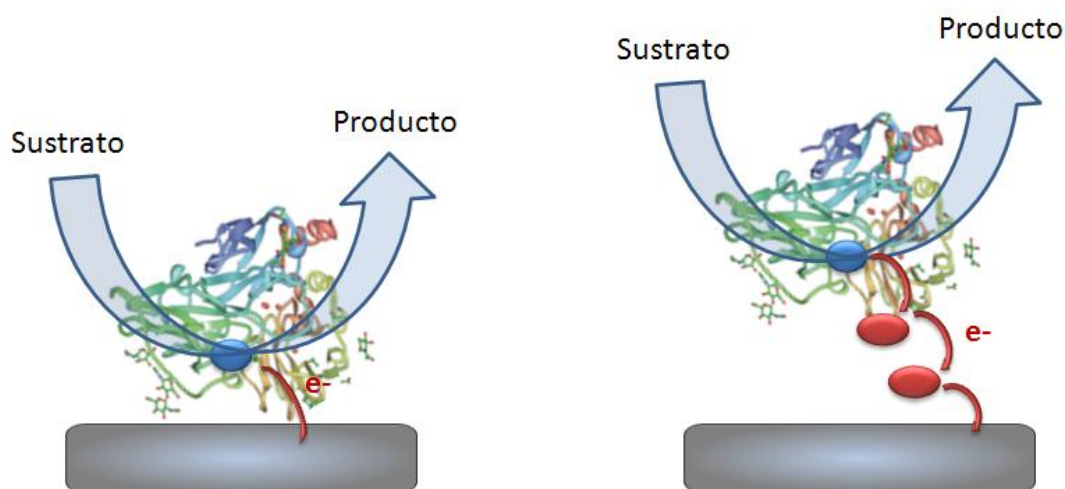


Figura 1.8. Representación de transferencia electrónica directa (TED, izquierda) y transferencia electrónica mediada (TM, derecha) entre el centro redox de una enzima (círculo color azul) y un electrodo para la oxidación de un sustrato. Los círculos de color rojo representan a un mediador redox.

En el caso de las lacasas existen dos posibles orientaciones para obtener TED, bien cuando el centro de cobre T1 se encuentra orientado hacia el electrodo o bien cuando lo está el centro T2/T3. La diferencia entre estas dos

posibles posiciones de la lacasa está en el producto que se obtiene en el proceso de reducción. Cuando la lacasa se encuentra orientada con el centro de cobre T1 hacia el electrodo, la reducción de O_2 será total, produciéndose agua, mientras que cuando se encuentre orientada a través del centro T2/T3 la reducción de O_2 será parcial, produciéndose agua oxigenada (Shleev, S.y col., 2006a).

Sin embargo, en las hidrogenasas la transferencia de electrones desde el centro activo hasta su aceptor de electrones tiene lugar a través de agrupaciones sulfoféricas, generalmente $[4Fe4S]$ o $[3Fe4S]$, que conducen los electrones hacia la superficie de la enzima (Marques, M. C.y col., 2010). El llamado “cluster” distal, porque es el más lejano del centro activo, es el encargado de transferir los electrones al aceptor electrónico *in vivo*, la proteína redox citocromo c3. Por lo que para que se establezca TED es necesario que la zona que rodea al “cluster” distal se encuentre orientada hacia el electrodo.

1.6. Aplicaciones electrocatalíticas de lacasas e hidrogenasas

Debido a las propiedades electrocatalíticas que poseen las lacasas presentan una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas. Su habilidad para producir radicales libres durante la oxidación de diferentes sustratos da lugar a aplicaciones muy variadas, por ejemplo en la industria textil, alimentaria, del papel, síntesis de detergentes, cosméticos, materiales antimicrobiales, e incluso en biorremediación (Zherdev, A. V.y col., 1999) (Couto, S. R.y col., 2006). La capacidad de transferencia electrónica directa o mediada de moléculas de lacasa a un electrodo se ha empleado para la creación de biocátodos de reducción de oxígeno en biopilas de combustible (Barton, S. C.y col., 2001) (Barton, S. C.y col., 2002) (Barton, S. C.y col., 2004). Las enzimas multicobre son candidatas adecuadas para actuar como bioelectrocatalizadores en cátodos ya que son capaces de reducir selectivamente el O_2 a H_2O con el empleo de cuatro electrones. En particular, las lacasas de alto potencial redox son muy interesantes para esta aplicación porque permitirían generar un mayor potencial en la biopila (Shleev, S.y col., 2005a).

Por otro lado, las hidrogenasas [NiFeSe] son actualmente catalizadores emergentes muy atractivos para aplicaciones biotecnológicas debido a su alta actividad catalítica, en particular a su alta actividad de producción de H_2 y su tolerancia a moderadas concentraciones de O_2 (Parkin, A. y col., 2008). Este tipo de hidrogenasas abre la puerta al diseño de celdas de combustible biológicas de celda única, donde no sería necesario el empleo de una membrana para separar el cátodo del ánodo, ya que podrían trabajar en las mismas condiciones. Además, las hidrogenasas catalizan la oxidación y producción de H_2 a velocidades comparables a las de metales como el platino, y además a bajo sobrepotencial (Jones, A. K. y col., 2002).

La inmovilización efectiva de estas metaloenzimas descritas sobre electrodos posibilita su estudio electroquímico y la aplicación de los bioánodos y biocátodos en celdas de combustibles o biosensores, para lo cual se requiere alta estabilidad enzimática y rápida transferencia electrónica entre la enzima y el electrodo (Nogala, W. y col., 2006). Además, para que las reacciones tengan lugar de forma directa (sin el auxilio de mediadores redox) es preciso que las enzimas se encuentren orientadas con el centro activo hacia el electrodo. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la orientación de la enzima sobre la superficie se produce al azar, por lo que no todas las enzimas que se encuentran inmovilizadas contribuyen a la electrocatálisis directa (Blanford, C. F. y col., 2007). Por lo tanto, la optimización de la orientación de las enzimas en la superficie aumentará considerablemente la intensidad de corriente catalítica directa.

Las celdas o pilas de combustible son unos dispositivos capaces de obtener directamente energía eléctrica a partir de compuestos químicos. Se produce la oxidación de un combustible en el ánodo y la reducción de un oxidante en el cátodo, los cuales se encuentran unidos a través de un hilo conductor que permite el paso de electrones desde el ánodo hasta el cátodo. Para completar el circuito, es necesario compensar las cargas mediante el transporte de protones desde el ánodo al cátodo. Cuando el ánodo y el cátodo se encuentran en un mismo compartimento no existen problemas para la compensación de cargas, pero sería necesario que ambos electrodos operen bajo las mismas condiciones. La colocación de una membrana intercambiadora de protones entre el ánodo y el cátodo permite usar disoluciones diferentes

para cada electrodo. Las pilas de combustible proporcionan electricidad mientras que el comburente y oxidante estén disponibles (Ryan O'Hayre, y col., 2006).

Las biopilas de combustible son celdas de combustibles que operan a bajas temperaturas y que en lugar de un catalizador metálico (generalmente platino) disponen de un catalizador biológico. Las biopilas no están limitadas al uso de hidrógeno o metanol como combustible y puede obtenerse electricidad a través sustratos orgánicos, siempre que el biocatalizador catalice su oxidación. Las biopilas de combustible pueden clasificarse en aquellas que usan células vivas como bacterias y algas, y aquellas que usan catalizadores extraídos de células, como enzimas y más recientemente mitocondrias como catalizadores biológicos (Moehlenbrock, M. J. y col., 2010).

El uso de células como biocatalizadores tiene gran interés desde la pasada década por sus aplicaciones en la transformación de biomasa en electricidad (Rabaey, K. y col., 2010) (Zhao, F. y col., 2009), y actualmente las pilas de combustible microbianas son estudiadas para su empleo en la eliminación de residuos por digestión anaerobia con la consiguiente generación de electricidad (Lovley, D. R., 2011), o para proporcionar energía a sensores en medios marinos (Girguis, P. R. y col., 2010).

Las pilas de combustible enzimáticas (Figura 1.9) pueden estar constituidas completamente por catalizadores enzimáticos tanto en el ánodo como el cátodo, o bien tener una constitución híbrida donde solamente uno de los dos electrodos está basado en catálisis enzimática, mientras el otro se basa en procesos electrocatalíticos de las celdas de combustible tradicionales.

El empleo de catalizadores biológicos ofrece una serie de ventajas como la versatilidad de productos catalizados bajo condiciones moderadas de pH y temperatura, especificidad de la reacción catalizada y la posibilidad de la eliminación de la membrana separadora.

Las primeras biopilas desarrolladas para funcionar en condiciones *in vivo* aparecieron en la década de los sesenta, basadas en oxidación de glucosa y reducción de O₂ (Yahiro, A. T. y col., 1964). Sin embargo, debido a su baja estabilidad y potencia no funcionaron, hasta que en los años 70 emergió la tecnología basada en baterías.

Actualmente, el desarrollo de las biopilas de combustible se centra en miniaturizar el dispositivo con el empleo de materiales nanoestructurados, eliminación de la membrana separadora y el estudio de biopilas implantables o semi-implantables. Así por ejemplo, se ha investigado que proporcionen de manera intermitente potencia a un monitor de glucosa subcutáneo que detecta niveles de glucosa en fluidos durante un periodo de días (Heller, A., 2005) (Heller, A., 2006).

Vincent y cols. han desarrollado una biopila de combustible basada en la hidrogenasa *Ralstonia metallidurans* en el ánodo y lacasa *Trametes Versicolor* en el cátodo. Tres celdas conectadas en serie fueron necesarias para proporcionar potencia suficiente para alimentar un reloj de pulsera durante 24 horas usando hidrógeno como combustible (Vincent, K. A.y col., 2005a). Otra posible aplicación de las biopilas de combustible se centra en proporcionar energía a dispositivos electrónicos portátiles (Gellett, W.y col., 2010) (Kamitaka, Y.y col., 2007).

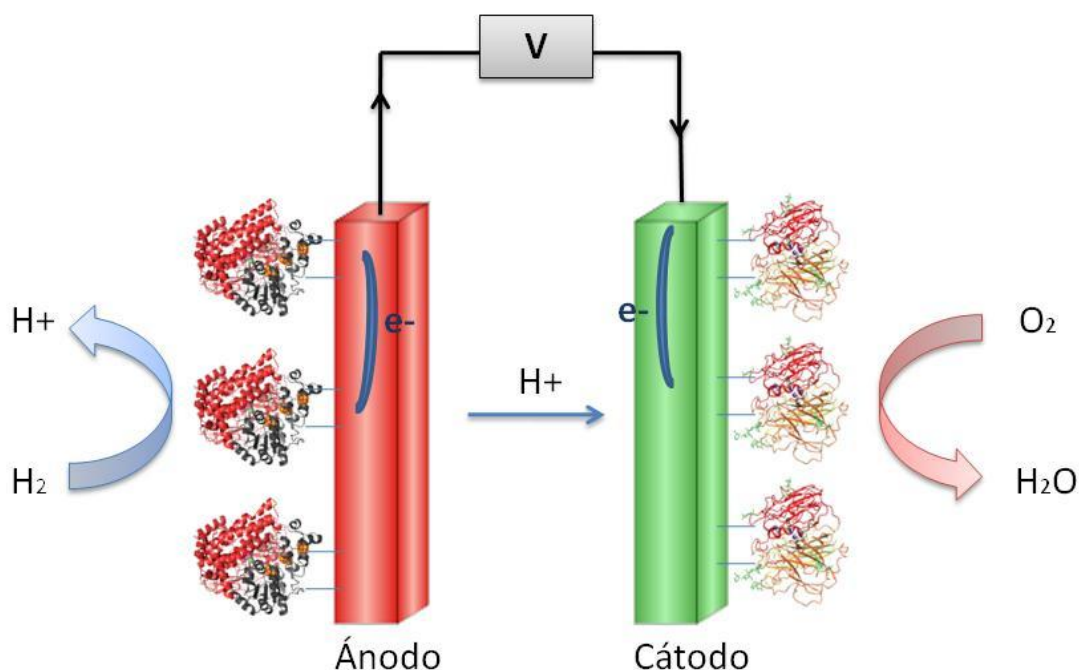


Figura 1.9. Modelo de una biopila de combustible sin membrana separadora. Ánodo constituido por hidrogenasa y cátodo por lacasa. Inmovilizadas covalentemente ambas enzimas sobre los electrodos.

A pesar de las interesantes aplicaciones de las biopilas de combustible, se deben investigar y desarrollar más algunos aspectos antes de su aplicación comercial. Factores como el voltaje de la celda, densidad de corriente catalítica y sobre todo la estabilidad operacional deben mejorarse notablemente.

Otro campo de aplicación de los electrodos enzimáticos es el de los biosensores. Los biosensores conjugan la especificidad de las reacciones biológicas con la gran sensibilidad que los últimos avances han conferido a las técnicas instrumentales. Un biosensor es un dispositivo en el que un elemento biológico actúa como sensor, se encuentra conectado o integrado dentro de un transductor apropiado. En la Figura 1.10, se muestra de forma esquemática un biosensor. El elemento biológico está compuesto por una capa bioactiva de moléculas responsables del reconocimiento biológico del analito acopladas a un transductor, capaz de convertir la respuesta del reconocimiento biológico en una señal procesable cuantificable. Los elementos biológicos más empleados son las enzimas (biosensores enzimáticos), anticuerpos (inmunosensores), ácidos nucleicos (chips de DNA) y microorganismos (Kress-Rogers, E., 1997).

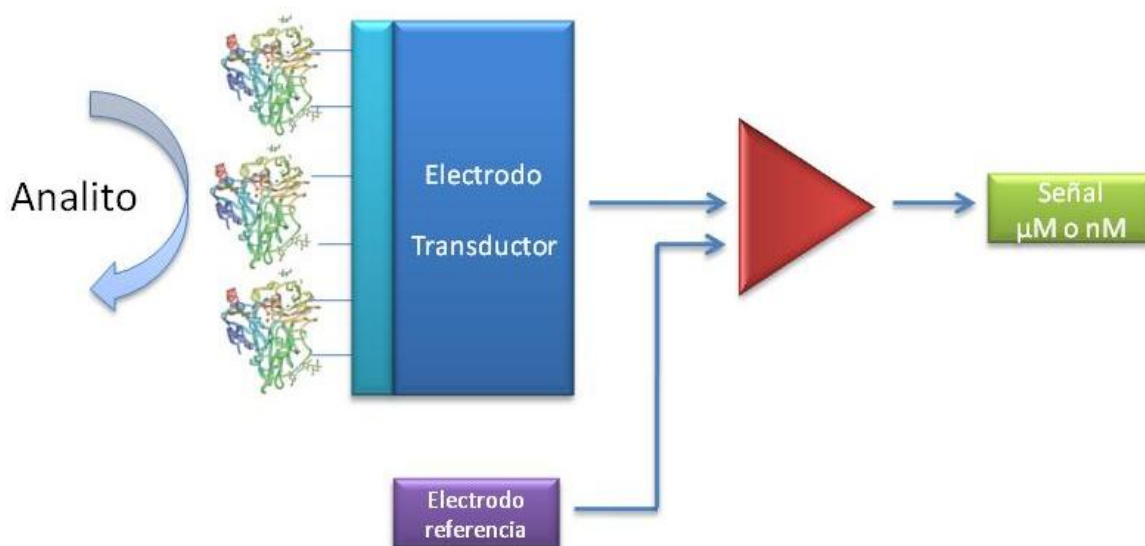


Figura 1.10. Diseño de un biosensor electroquímico y enzimático.

Los biosensores presentan bastantes ventajas frente a las técnicas de análisis convencionales, como una gran especificidad aportada por el elemento biológico, alta sensibilidad, tiempos cortos de análisis y la posibilidad de reutilizar el componente biológico (Kress-Rogers, E., 1997).

El primer biosensor desarrollado se debe a Clark y Lyons, que inmovilizaron glucosa oxidasa sobre un electrodo para determinar glucosa. Con él pusieron de manifiesto la posibilidad de inmovilización de enzimas sobre un detector electroquímico, dando lugar a los biosensores amperométricos basados en enzimas. Desde entonces los avances en este campo se han encaminado hacia el desarrollo de nuevas técnicas de inmovilización y estabilización de biomoléculas, y hacia el acoplamiento y utilización de nuevos medios de transducción más sensibles (Barbadillo, M.y col., 2009) (Domínguez-Renedo, O.y col., 2012) (García, T.y col., 2012) (Moreno-Guzmán, M.y col., 2012) (Sanllorente-Méndez, S.y col., 2012) (Serafín, V.y col., 2012).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis ha sido desarrollar estrategias de inmovilización de metaloenzimas redox sobre electrodos de forma orientada y estable con el fin de obtener transferencia electrónica directa entre la enzima y el electrodo. Se ha incidido en el control a escala nanométrica de la construcción del electrodo enzimático, considerando tanto la estructura del electrodo como la arquitectura molecular desarrollada sobre la superficie.

Para cumplir con el objetivo principal se han abordado los siguientes objetivos parciales:

- Caracterización de la hidrogenasa de membrana, de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough.
- Funcionalización de electrodos de oro y carbono con monocapas de moléculas orgánicas que permitan la unión covalente de enzimas.
- Diseño de una estrategia de inmovilización covalente y específica para la hidrogenasa de membrana de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, de modo que se controle la orientación de las moléculas de enzima sobre el electrodo y al mismo tiempo se mantenga su conformación más estable mediante la incorporación de una bicapa fosfolipídica sobre el electrodo.
- Diseño de estrategias de inmovilización covalente específicas para la lacasa de *Trametes hirsuta* con el fin de optimizar su recubrimiento sobre el electrodo, la transferencia electrónica directa y la estabilidad operacional.
- Empleo de electrodos nanoestructurados para incrementar las densidades de corriente biocatalíticas obtenidas previamente con electrodos planos.
- Estudio del efecto de los inhibidores en los electrodos enzimáticos.
- Caracterización electroquímica, microscópica y espectroscópica de los electrodos enzimáticos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos, disolventes y gases

- 2,2'-azinobis-(3-etilbencentiazoline-6-sulfonato) sal de diamonio (ABTS), 98 %, Sigma-Aldrich
- Acetonitrilo grado HPLC, Scharlau
- Acetato de sodio 3-hidrato, >99.5%, Fluka
- Ácido acético, 99 %, Prolabo
- Ácido clorhídrico, 37%, Panreac
- Ácido mercaptopropiónico, >99 %, Fluka
- Ácido nítrico 65%, Panreac
- Ácido sulfúrico, 96%, Panreac
- Ácido tióctico, pureza 99 %, Sigma
- Agua Mili-Q purificada con un Mili-Q Plus EQ-A2/02 de Millipore, 18,2 MΩ·cm
- Argón 99,999 %, Air liquide
- 4-aminotiofenol (4-ATP) 97%, Aldrich
- Antraquinona-1-5-disulfónico, ICN Pharmaceuticals
- Bencil viológeno, Sigma
- Calbiosorb Adsorbent, Calbiochem
- Cistamina dihidrocloruro, Sigma-Aldrich
- Citrato Sódico
- Cloroformo, $\geq 99,8$ %, Sigma
- Cloruro de oro e hidrógeno, (49% contenido en oro) Sigma
- Cloruro potásico (KCl), 99%, Panreac
- Cloruro sódico (NaCl), 98%, Panreac
- Deuterio (D₂), 20% en Argón, Air Liquide
- Di-hidrógeno fosfato sódico 2-hidrato, 99%, Panreac
- Ditionito sódico (Na₂S₂O₄), Merck

- 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodimida (EDC) >99%, Sigma Aldrich
- Etanol absoluto (EtOH), Panreac
- Fast Black K-Salt, Fluka
- Ferricianuro de potasio, 99%, Aldrich
- Ferroceno de potasio, 99%, Aldrich
- Fluoruro sódico, 97 %, Sigma-Aldrich
- Glucosa, 99 %, Sigma-Aldrich
- Hidrocloruro de Metilviológeno hidrato, 98%, Aldrich
- Hidróxido de potasio, 97.5%, Probus
- Hidróxido de sodio, lentejas, Panreac
- Hidrógeno, Air Liquide
- Hidrógeno fosfato disódico 12-hidrato, 99 %, Panreac
- Índigo carmín, Fluka
- Índigo tetrasulfonato, Aldrich
- 2-mercaptoetanol, Sigma-Aldrich
- 6-mercapto-1-hexanol (MH), 97 %, Sigma-Aldrich
- ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES) hidratado, 99.5%, Sigma
- Metil viológeno, Sigma
- N-dodecil B-D-maltosida (DDM), SigmaAldrich
- (N-dodecil-n-n-dimetilamonio)-1-propanosulfonato, SigmaAldrich
- (N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfónico) (HEPES), 99.5%, Sigma
- N-hidroxisuccinimida (NHS), 97%, Fluka
- Nitrito sódico, 99,99 %, Sigma-Aldrich
- Nitrógeno 99,999%, Air Liquide
- Oxígeno, Alphagaz 1, Air liquid
- Pasta de alúmina, con tamaño de partícula 0,05, 0,3, 1µm, Buheler
- Perclorato sódico, 98 %, Sigma-Aldrich
- Periodato sódico 99 %, Panreac
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂), 30%, Riedel de Haén
- Sal de diazonio de perclorato 4-nitrobenceno, Aldrich
- Suero fisiológico inyectable Vitulia (isotónico)
- Disolución de Escherichia coli polar, fracción polar, Avanti
- Tetrafluoruro de tetrabutilamonio, Aldrich

- Cloruro de tetrakis(hidroxifenil)fosfonio 80%, Fluka

Todas las disoluciones se realizaron usando agua desionizada Mili-Q, 18,2 M Ω · cm.

3.1.2. Material y equipos de laboratorio

- Agitador magnético RET y RCT Basic, IKA
- Agitador vortex MSE, microcentaur
- Balanza ADA 70/L, precisión 100 μ g
- Baño de agua calefactor Pharmacia Biotech MultiTemp III
- Baños termostatzados Tectron P-selectra, Julabo
- Baño de ultrasonidos, P-selectra
- Cámara anaerobia MBraun Unilab
- Cámara anaerobia Mecaplex
- Celdas electroquímicas realizadas en el Taller de Vidrio del Instituto de Catálisis
- Centrífuga 5424, Eppendorf
- Cinta de teflón, uso gas, 12 mm x 12 mt x 0,1
- Contraelectrodo, hilo de platino, 0.5 mm de diámetro, Goodfellow
- Electrodos de referencia Ag/AgCl (BAS), Calomelanos (Radiometer analytical)
- Espectrómetro de masas Masstorr DX 200, VG Quadrupoles Ltd.
- Espectrómetro de masas, Pfeiffer Prisma
- Espectrómetro FTIR Magna 860, Nicolet
- Espectrómetro UV-Vis, UVICON 940 Kontron Instruments
- Espectrómetro UV-Vis, Shimadzu UV-2401 PC
- Filtros de ultra centrífuga Amicon con peso molecular de corte de 30 kDa
- Filtros de oxígeno Varian Chrompack CP17970
- Manta calefactora, isopad
- Micropipetas 10, 200, 1000 μ l y 5 ml, Accumax
- Papel abrasivo de grano fino 2 7/8" (7,3 cm), Buehler
- Puntas de micropipeta de 10, 200, 1000 μ l y 5 ml, Dalab

- Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT30 con módulo de impedancia, software GPES 4.9 y FRA. Ecochemie
- Electrodo rotatorio, Pine Instruments controlado por unidad MSRX
- pH metro, pH meter 691, Metrohm

3.1.3. Soportes de inmovilización

Se emplearon materiales metálicos y no metálicos capaces de conducir la electricidad como soporte de inmovilización de las enzimas empleadas y usados como electrodos de trabajo. Se usaron los siguientes materiales:

GRAFITO:

- Grafito pirolítico altamente ordenado “edge” (HOPG) (Pine Instruments)
- Grafito de baja densidad (LGD): Barra de grafito de baja densidad de 3 mm de diámetro y 99,9999 % de pureza (Sigma Aldrich)
- 3D-CNT/CMF: Electrodo cedido por el Prof. Wolfgang Schuhmann de la Ruhr-Universität Bochum, Alemania

Los electrodos LGD y 3D-CNT/CMF tienen una geometría cilíndrica. Los laterales de los electrodos se aislaron con cinta de teflón y así exponer sólo la base a la disolución electroquímica. Posteriormente se encajaron en una pieza de teflón, fabricada en el Taller Mecánico del Instituto de Catálisis, para su adaptación al rotor MSRX de Pine Instruments. De este modo se pudieron realizar medidas electroquímicas con rotación.

ORO:

- Oro policristalino de 0,5 cm de diámetro (Pine Instruments)
- Placas de oro de (1x1) cm² (Metal-Handel Schroer GmbH)
- Hilo de Oro de 0,25 mm de diámetro (Goodfellow Cambridge Limited)
- Oro mesoporoso (AuMP): Electrodo proporcionado por el Prof. Edmond Magner de la Universidad de Limerick, Irlanda

3.1.4. Enzimas

3.2.4.1. Extracción y purificación de hidrogenasas

La hidrogenasa de [NiFeSe] de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Hasa DvH) fue aislada en el laboratorio de la Prof. Inês A. C. Pereira (Instituto de Tecnologia e Biologica. Universidade Nova de Lisboa) donde realicé una estancia durante mi tesis doctoral.

El método seguido se resume en el esquema de la Figura 3.1.1. Del extracto de las membranas de las células de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (DSM 644) crecidas en un medio de lactato/sulfato, a 37 °C, se extrae y purifica Hasa DvH, en dos conformaciones distintas, llamadas de membrana y soluble. La Hasa DvH_{membrana} se obtiene con detergente 0,2 % (w/v) Zwittergent 3-12 (N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato) de la fracción de membrana y la Hasa DvH_{soluble} de la fracción soluble, donde no es necesario el uso de detergente (Valente, F.y col., 2005).

Una vez obtenidas la fracción soluble y de membrana se procede a la purificación.

Todos los experimentos se realizaron en una cámara frigorífica a 4 °C y en presencia de 0,2 % (w/v) Zwittergent 3-12 (N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato) ya que se trata de la fracción de membrana.

La fracción de membrana obtenida, de color marrón y con un volumen de 160 ml, se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, empleando una columna Q-sepharose FF (Fast Flow) usando como eluyente 20 mM tampón Tris-HCl pH 7,6, la fuerza iónica de la fase móvil se aumenta aplicando un gradiente lineal de 0 mM a 400 mM NaCl.

Las muestras se agrupan en fracciones y son concentradas por ultrafiltración, mediante daiafolm, con una membrana de corte molecular de 30 KDa. Las fracciones obtenidas se analizan mediante un espectro de UV-Vis y un análisis de cromatografía de gases para detectar la presencia de actividad hidrogenasa en dicha fracción.

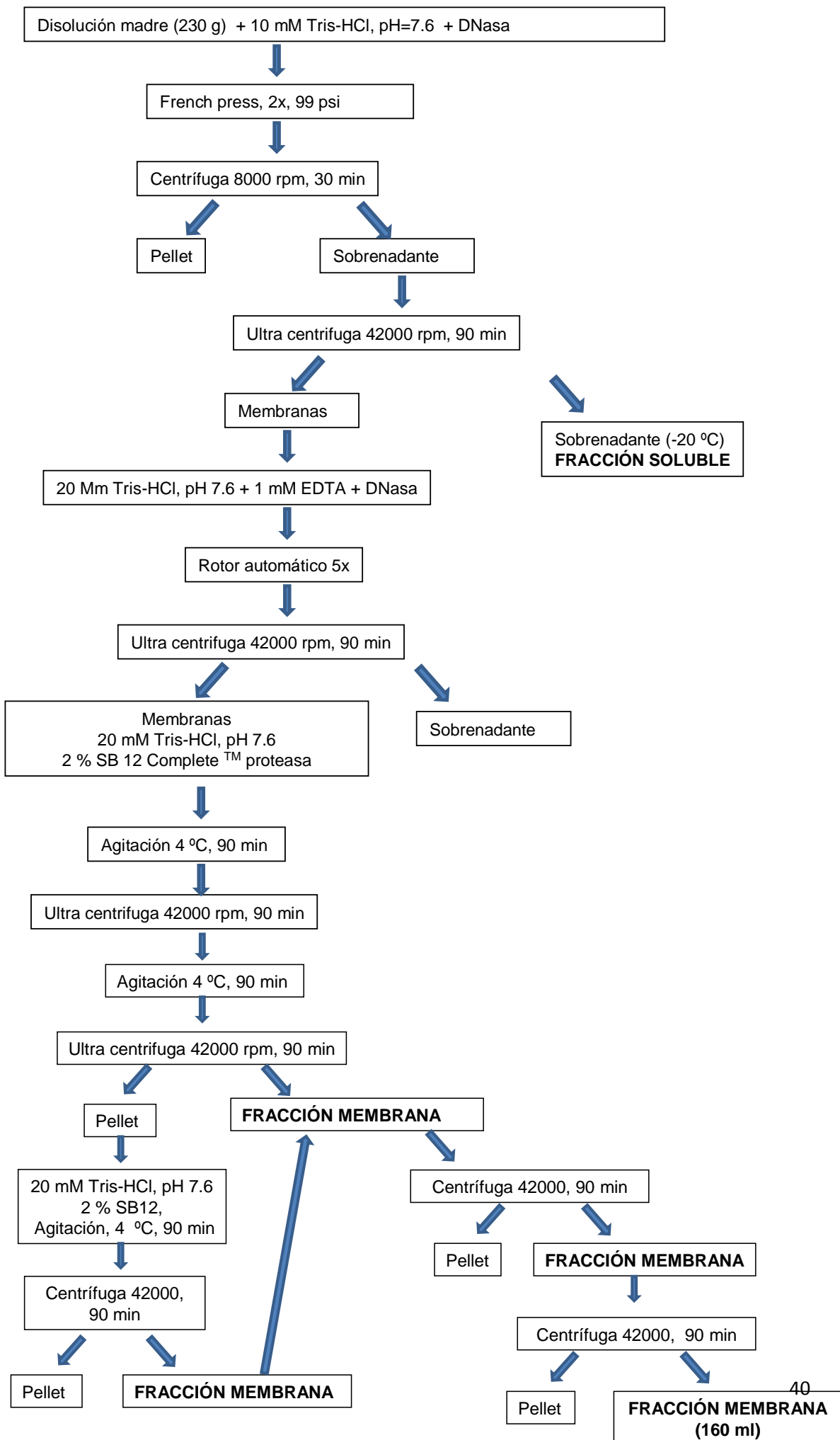


Figura 3.1.1. Pasos seguidos para la extracción de hidrogenasa [NiFeSe], forma soluble y de membrana.

Una vez obtenidas la fracción soluble y de membrana se procede a la purificación.

Todos los experimentos se realizaron en una cámara frigorífica a 4 °C y en presencia de 0,2 % (w/v) Zwittergent 3-12 (N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato) ya que se trata de la fracción de membrana.

La fracción de membrana obtenida, de color marrón y con un volumen de 160 ml, se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico, empleando una columna Q-sepharose FF (Fast Flow) usando como eluyente 20 mM tampón Tris-HCl pH 7,6, la fuerza iónica de la fase móvil se aumenta aplicando un gradiente lineal de 0 mM a 400 mM NaCl.

Las muestras se agrupan en fracciones y son concentradas por ultrafiltración, mediante daiafolm, con una membrana de corte molecular de 30 KDa. Las fracciones obtenidas se analizan mediante un espectro de UV-Vis y un análisis de cromatografía de gases para detectar la presencia de actividad hidrogenasa en dicha fracción.

Se realizó una segunda cromatografía en columna Q-sepharose (26/10), equilibrada con 50 mM Tris-HCl, el flujo empleado fue de 5 ml/min. De las fracciones que presentan actividad enzimática de hidrogenasa, se concentraron por ultrafiltración y se volvió a comprobar que existía hidrogenasa en las fracciones obtenidas.

Se procedió a realizar una tercera cromatografía en columna Q-sepharose (16/10), como último paso, empleando como eluyente 100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl a un flujo de 1,5 ml/min.

Para certificar que la de hidrogenasa, que se ha separado del resto, que esté pura, se realizó electroforesis de proteínas, en gel SDS y gel nativo.

3.2.4.2. Lacasa *Trametes hirsuta*

La lacasa de *Trametes hirsuta*, fue proporcionada por el Profesor Sergey Shleev, de la Universidad de Malmö, Suecia. La lacasa fue extraída y purificada como se describe Shleev y cols. (Shleev, S. V.y col., 2004).

3.2.4.3. Peroxidasa de Rábano tipo (HRP)

Enzima comercial suministrada por Sigma Aldrich.

3.2. Métodos

3.2.1. Métodos analíticos de identificación de hidrogenasa

Se realizaron electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes, en presencia de detergente aniónico, SDS (SDS-PAGE).

El peso molecular de la hidrogenasa se determinó realizando un gel SDS 12 % usando proteínas estándares de BioRad.

La actividad de producción de H_2 se detectó empleando un gel nativo como lo describe Ackrell BAC y cols. en 10 % de gel de poliacrilamida, conteniendo 0,1% de Tritón X-100 (Ackrell B. A. C. y col., 1996). El tampón revelador contenía 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0.5 mM metil viológeno, en condiciones anaerobias, para ello se realizaron varios ciclos de vacío y argón y posteriormente se saturó bajo H_2 .

3.2.2. Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)

Los experimentos de FTIR se realizaron en un espectrómetro Magna 860 (Nicolet) equipado con un detector MCT y un sistema de purga para eliminar CO_2 y H_2O de la atmósfera de medida (Whatman).

Las medidas se realizaron manteniendo la temperatura a 25 °C con un baño termostatzado (Julabo).

Para algunas de las medidas de FTIR se empleó una celdilla de transmisión de CaF_2 y 82 μm de longitud de paso óptico.

Las medidas espectroelectroquímicas de FTIR se realizaron en la celdilla descrita por Moss y cols., de 7,5 μm de longitud de paso óptico (Moss, D. y col., 1990). Las medidas se hicieron con muestras concentradas de hidrogenasa entre 0,6-1 mM por ultrafiltración en Centricon con una masa molecular de corte de 30 KDa en una centrífuga. Se depositaron 10 μl de muestra en tampón Tris 20 mM, pH 8, 0,2 M KCl y 1 μl de una mezcla de mediadores redox, 0,05 mM cada uno, en el mismo tampón para realizar las titulaciones redox. Los mediadores empleados fueron índigo tetrasulfonato ($E'_0 = -76$ mM a pH 8),

índigocarmín ($E'_0 = -163$ mM a pH 8), antraquinona-1-5-disulfónico ($E'_0 = -234$ mM a pH 8), antraquinona-2-sulfonato ($E'_0 = -277$ mM a pH 8), bencil viológeno ($E'_0 = -358$ mM a pH 8) y metil viológeno ($E'_0 = -449$ mM a pH 8).

3.2.3. Medidas de actividad

3.2.3.1. Preparación de la muestra de hidrogenasa

Para realizar las medidas de actividad, se prepararon diferentes diluciones de hidrogenasa [NiFeSe], en tampón Tris-HCl, 20 mM pH 7,6, 0,2 % (N-dodecil-N-N-dimetilamonio)-1-propanosulfonato. Se realizaron ciclos de vacío/Argón para eliminar el O_2 existente y posteriormente se incubó la disolución de hidrogenasa durante 10 min bajo H_2 a temperatura ambiente.

3.2.3.2. Ensayo de Intercambio isotópico D^+/H^+

Los experimentos se realizaron en una celda de reacción anaerobia conectada a través de unas membranas de teflón de 14 μm de espesor, permeable al gas y protegida por una rejilla de teflón a un espectrómetro de masas. La temperatura de la celda se controló mediante una camisa de agua y un baño termostatzado a 30 °C. Se depositaron 10 ml de tampón fosfato 20 mM, pH 7 y se realizó previamente un calibrado de la respuesta del equipo con H_2 al 100% y con D_2 al 20% en Ar. Para medir la actividad se añadió 1 μl de ditionito sódico 1 M para eliminar el oxígeno residual a la disolución saturada con D_2 al 20% y posteriormente una alícuota de muestra de hidrogenasa. Se monitorizaron las masas 2, 3, 4, 28 y 32 para poder medir simultáneamente la evolución de H_2 , HD, D_2 , y O_2 respectivamente.

La señal eléctrica proporcionada por el detector del espectrómetro para cada masa analizada es proporcional a la presión parcial del correspondiente gas en la celda de medida (Vignais, P. M. y col., 2002).

3.2.3.3. Ensayo de consumo de H_2

Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible (UVIKON 940), midiendo a una longitud de onda de 400 nm o 600 nm. Se usó bencil

viológeno (BV) o metil viológeno (MV) como aceptor de electrones respectivamente. Los coeficientes de extinción molar son de $8,1 \text{ mMcm}^{-1}$ y $13,4 \text{ mMcm}^{-1}$ para BV y MV respectivamente.

En una cubeta de cuarzo se depositaron 2,8 ml de BV 0.1 mM o de MV 1 mM en tampón fosfato 20 mM pH 7. Se realizaron varios ciclos de vacío/Argón para eliminar el O_2 y se saturó la disolución con H_2 100%. Se incubó la muestra a 37°C en un baño termostático. A continuación se añadió ditionito sódico 100 mM hasta que la disolución adquirió una leve coloración azul, indicándonos que no hay O_2 residual en la disolución. Para comenzar la medida de actividad de consumo de H_2 se inyectó 1-3 μl de disolución de enzima a una concentración de 27 μM y se midió la velocidad de producción de viológeno reducido.

3.2.3.4. Producción de H_2

La actividad de producción de H_2 se determinó empleando cromatografía de gases. En un baño térmico a 37°C y con agitación como se describe en (Peck Jr, H. D. y col., 1956) donde se reduce una disolución de MV con ditionito sódico. Se añadieron alícuotas de hidrogenasa en tampón pH 7, se esperó 10 min y a continuación se realizó un cromatograma del gas obtenido. El tiempo de retención del H_2 en el cromatógrafo es 1 minuto.

3.2.4. Ensayo actividad de lacasa

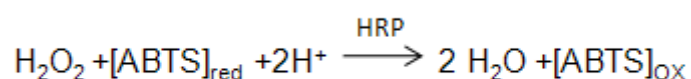
Las medidas de actividad se realizaron en el espectrofotómetro, empleando ABTS y O_2 como sustratos. La oxidación enzimática de ABTS genera un radical, $\text{ABTS}^{\cdot+}$, el cual presenta un máximo de absorción a 405 nm y un coeficiente de extinción de $36,8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Los experimentos se realizaron en condiciones aeróbicas y a temperatura ambiente en tampón acetato 50 mM NaClO_4 100 mM, pH 4,2. A 1 ml de ABTS 1mM se añadió 10 μl de lacasa en diferentes diluciones para medir la velocidad de producción de $\text{ABTS}^{\cdot+}$.

3.2.5. Detección de agua oxigenada

La concentración de agua oxigenada producida por la lacasa inmovilizada sobre el electrodo se detectó espectrofotométricamente (Pita, M. y

col., 2006). Se colocaron 890 µl de la disolución de la celda electroquímica en una cubeta espectrofotométrica. Y a continuación se añadió ABTS 9,1 mM y enzima peroxidasa (HRP) 0,5 mg/ml hasta conseguir un volumen final de 1 ml. Se dejó que se completara la reacción enzimática durante 8 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia final a 405 nm es proporcional a la concentración de agua oxigenada teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar del ABTS y la estequiometría de la reacción:



3.2.6. Funcionalización de electrodos

3.2.6.1. Electrodos de carbono

3.2.6.1.1. Pretratamiento

Se emplearon puntas de electrodos rotatorios de carbono pirolítico altamente orientado (HOPG) plano “edge” de 0,5 cm de diámetro (Pine Instruments) como electrodo de trabajo. Se pulieron en un papel abrasivo de grano fino 2 7/8” (7,3 cm) Dia y posteriormente se pulieron sucesivamente con alúmina de 1, 0,3 y 0,05 µm para obtener una superficie lisa de aspecto especular. A continuación, se sonicaron en etanol/agua (1:2) durante 10 min.

También se emplearon electrodos de grafito de baja densidad (LGD) de 0,3 mm de diámetro (Sigma), en los cuales se realizó el mismo pretratamiento que en los electrodos HOPG pero sin el pulido con alúmina.

3.2.6.1.2. Modificación de electrodos de carbono con sales de diazonio

Se realizó una modificación electroquímica mediante la aplicación de dos ciclos de voltamperometría entre 0,75 y 0 V a 0,2 V/s en una celda electroquímica con una disolución 2 mM de sal de diazonio de perclorato 4-nitrobenceno en acetonitrilo y usando tetrafluoroborato de tetrabutilamonio 0,1 M como electrolito soporte. Se empleó como electrodo de referencia (Ag/AgCl)

y como contraelectrodo un hilo de platino. De esta manera se obtuvieron grupos nitrofenilos covalentemente unidos a la superficie de carbono mediante un enlace carbono-carbono, como se puede observar en la Figura 3.2.1.

También se modificó el electrodo de manera no electroquímica, para ello se sumergió el electrodo en una disolución 10 mM de sal de diazonio 4-nitrofenilo en acetonitrilo durante 30 min. Finalmente el electrodo se lavó con acetonitrilo.

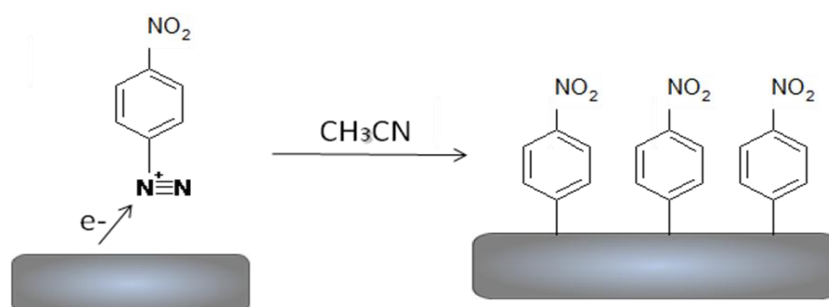


Figura 3.2.1. Representación esquemática de la modificación electroquímica de una superficie de carbono con sal de diazonio 4-nitrobenzeno en CH_3CN , conteniendo BF_4ClO_4 100 mM.

3.2.6.1.3. Reducción del grupo nitro a amino

Una vez modificado el electrodo con grupos 4-nitrofenilo se redujeron electroquímicamente los grupos nitro a amino, como se puede observar en la Figura 3.2.2, obteniendo grupos 4-aminofenilos en la superficie del electrodo. Para ello se depositó en una celda electroquímica una mezcla de etanol/agua (1:9) con KCl 0,1M como electrolito soporte y se realizaron dos ciclos de voltamperometría entre 0 y -1,4 V vs Ag/AgCl a una velocidad de barrido de 0,2 V/s. Esta reducción también se realizó en H_2SO_4 0,1 M, HCl 0,1 M, donde los potenciales aplicados en este caso fueron entre 0,6 y -0,8 V vs Ag/AgCl.

La reducción electroquímica de los grupos nitro a amino realizada no es total, ya que una parte de los grupos permanece en forma de hidroxilaminas, que corresponden al equilibrio redox que aparece a 0,3 V vs Ag/AgCl en la voltamperometría de reducción (Figura 3.3.2) (Brooksby, P. A.y col., 2004).

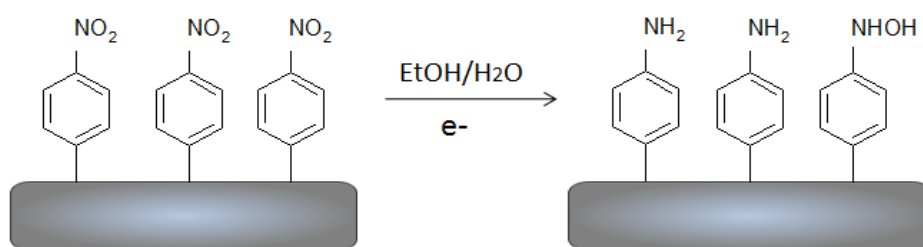


Figura 3.2.2. Reducción electroquímica de los grupos 4-nitrofenilo a 4-aminofenilos sobre un electrodo en presencia de EtOH/H₂O 9:1, KCl 0,1 M.

3.2.6.2. Electrodos de oro

3.2.6.2.1. Pretratamiento

Las puntas de electrodos rotatorios de oro policristalino de 0,5 cm de diámetro (Pine Instruments) se limpiaron mediante 25 ciclos de voltamperometría entre 0 y -1,5 V vs Ag/AgCl a una velocidad de barrido de 0,2 V/s en NaOH 0,5 M, a continuación los electrodos se sumergieron en una disolución piraña recién preparada (H₂SO₄/H₂O₂, 3:1) durante 5 min, se lavaron en agua mili-Q y se pulieron con pasta de alúmina 0.05 µm sobre un paño de pulido (Buehler). Se sonicaron en etanol/agua (1:2) durante 10 min. Se realizó una limpieza reductiva en NaOH 0,5 M, 25 ciclos a 0,2 V/s entre 0 y -1,5 V vs Ag/AgCl. A continuación, se realizó una limpieza oxidativa en H₂SO₄ 0,5 M haciendo 25 ciclos entre 0 y 1,5 V vs Ag/AgCl a 0,1 V/s.

Mediante la integración del pico catódico asociado con la reducción de los óxidos formados en la superficie de oro, el cual se observa aproximadamente a 0,8 V vs Ag/AgCl, se pudo determinar el área microscópica del electrodo mediante el factor de conversión de 482 µC/cm², ya que se trata de un electrodo de policristalino (Oesch, U.y col., 1983).

Finalmente, se lavó el electrodo con agua Mili-Q.

También se usaron placas de oro de (1x1) cm² (Metal-Handel Schroer GMBH), las cuales se limpiaron con piraña durante 3 min y se lavaron con agua Mili-Q. A continuación se flamearon con una llama de propano durante unos segundos. Esta operación se realizó cinco veces, para producir terrazas de Au (111) en la superficie. Estas placas de oro fueron empleadas como soporte en

los estudios de caracterización de AFM y como electrodos de trabajo en experimentos electroquímicos.

Además se emplearon electrodos de hilo de oro de 0,25 mm de diámetro (Goodfellow Cambridge Limited) soportados en una estructura de latón diseñada para facilitar las conexiones eléctricas y prepararlos siempre con la misma longitud, de modo que el área geométrica modificada fuera constante. Se realizó el mismo tratamiento que para las placas de oro.

3.2.6.2.2. Modificación de los electrodos de oro con monocapas autoensabladas (SAM's) de tioles

Los electrodos de oro se modificaron para poder obtener grupos amino en la superficie del electrodo, sumergiéndolos en una disolución 1mM de 4-aminotiofenol (4-ATP) en etanol durante 18 horas a temperatura ambiente como se representa en la Figura 3.2.3. Posteriormente el electrodo se lavó en etanol durante 5 min con agitación.

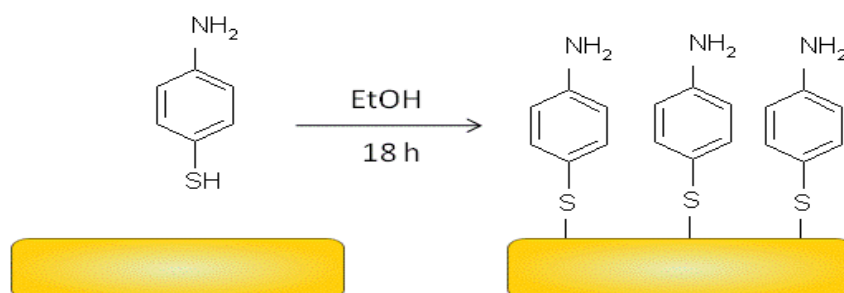


Figura 3.2.3. Modificación de una superficie de oro con SAM de 4-ATP.

3.2.6.2.3. Modificación de electrodos de oro con monocapa mixta (sal de diazonio y SAM)

Los electrodos de oro que previamente se han sometido al pretratamiento descrito anteriormente, se sumergieron en una disolución de sal de diazonio perclorato de 4-nitrofenilo en acetonitrilo 2 mM y 100 mM BF_4ClO_4 y se modificaron electroquímicamente mediante un ciclo de voltamperometría cíclica entre 0,6 y -0,6 V vs Ag/AgCl a 200 mV/s. Posteriormente los grupos nitro generados sobre la superficie del electrodo, se redujeron a amino en

presencia de EtOH/H₂O 9:1 y 0,1 M KCl, mediante dos ciclos de voltamperometría entre 0 y -1,4 V vs Ag/AgCl a 200 mV/s, como en los electros de carbono.

Finalmente, para modificar las posibles regiones de oro desnudo en el electrodo modificado con grupos amino, se sumergió en una disolución 1mM de tiol en etanol durante 18 h a temperatura ambiente (como se indica en el apartado anterior). Los tioles estudiados fueron: 4-ATP, ácido tióctico, diamina, ácido mercaptopropiónico, 2-mercaptoetanol y 6-mercapto-1-hexanol.

3.2.6.3. Electrodos de carbono modificados con nanopartículas de oro (AuNP)

Los electrodos LGD se modificaron con una monocapa de grupos amino como se indica en el apartado 3.2.4.1. Una vez modificado el electrodo con grupos amino, se sumergió en una disolución de nitrito sódico 1 mg/ml en HCl 1 M durante 2 h, para transformar los grupos amino en grupos azo (Freeman, H. S.y col., 1986).

Posteriormente, el electrodo se incubó durante 3 días en una disolución de nanopartículas de oro (AuNP), de (5 ± 3) nm de diámetro (Duff, D. G.y col., 1993), o de (16 ± 2) nm de diámetro (Frens, G., 1973) para que los grupos azo reaccionen con las AuNP formándose enlaces covalentes Au-C sp² (ver esquema 5.4.1).

El oro del electrodo LDG recubierto por AuNP se determinó por voltamperometría cíclica entre 0 a 1,5 V vs Ag/AgCl a 200 mV/s en H₂SO₄ 0,1 M.

Finalmente, el electrodo se funcionalizó con una monocapa mixta como se indica en el apartado 3.2.4.2.3 y como se puede observar en la siguiente Figura 3.2.4.

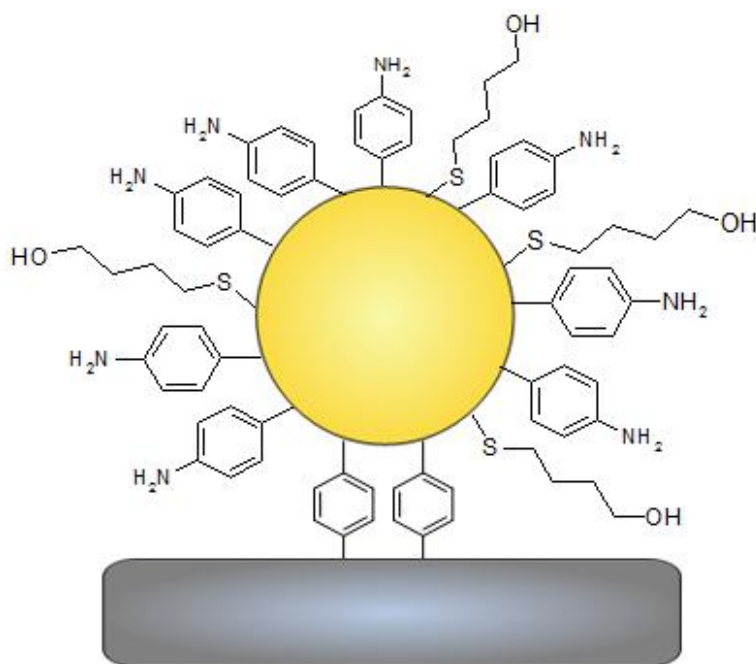


Figura 3.2.4. Resultado final de la funcionalización de un electrodo de carbono con AuNP y la monocapa mixta.

La preparación de las muestras de los electrodos LDG-AuNP para el análisis por TEM-EDX se realizó de la siguiente manera:

Se pulieron los electrodos sobre un papel de lija realizando cinco ochos. Las virutas generadas se recogieron, se dispersaron en 500 μ l de etanol y se sometieron a ultra sonidos durante 15 min. Se tomó una gota de la dispersión y se depositó sobre una rejilla de cobre para observar la muestra por TEM-EDX.

El tamaño de estas AuNP se midió a partir de su espectro de absorción de radiación UV-Vis, y ajustando los valores de su resonancia de plasmón superficial según el método numérico de Haiss y cols (Haiss, W.y col., 2007). Dicho método, según dice el artículo, da un error del 10% aprox.

3.2.7. Inmovilización de hidrogenasa sobre electrodos

3.2.7.1. Electrodo de carbono

Una vez modificado el electrodo con grupos amino en la superficie, se depositó sobre él 6 μ l de disolución de Hasa DvH 27 μ M en tampón MES 10 mM pH6, 0,2 % DDM durante 20 minutos para que se orientara adecuadamente la enzima sobre el electrodo. A continuación se añadió 4,5 μ l de disolución de hidrocloreuro de N-hidroxisuccinimida 14mM y 5,5 μ l de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodimida 21 mM para formar un enlace covalente entre la enzima y el electrodo. Todas las disoluciones se prepararon en tampón MES 10 mM pH 6. Se tapó la disolución para evitar su evaporización. Después de 90 minutos de reacción se lavó el electrodo con tampón fosfato 0,1 M y KCl 0.25 M con agitación durante 5 minutos.

3.2.7.2. Electrodos de oro

3.2.7.2.1. Inmovilización covalente de Hasa D. V. Hildenborough

Sobre el electrodo de oro modificado con grupos amino en la superficie se depositó 15 μ l de Hasa DvH 27 μ M en tampón MES 10 mM, pH 6, 0,1 % DDM durante 20 min. Posteriormente se añadió 14 μ l de NHS 14 mM y 17 μ l de ECD 21 mM en tampón MES 10 mM, pH 6, 0,1 % DDM. Se dejó reaccionar durante 30 min y a continuación se lavó el electrodo con una disolución de tampón fosfato 0,1 M, pH 7 con KCl 0,25 M.

3.2.7.2.2. Inserción de Hasa D. V. Hildenborough en una bicapa lipídica

Sobre el electrodo de oro modificado con una monocapa autoensamblada de 4-ATP se formó una bicapa de fosfolípidos añadiendo 0,6 mg/ml de una dispersión de liposomas en tampón MES 10 mM, pH 5 durante 15 minutos y se lavó a continuación con tampón fosfato 0,1 M. Sobre 0,2 cm² de la superficie de oro modificada se añadió 18 μ l de Hasa DvH 27 μ M en tampón MES 10 mM, pH 6, 0,1 % DDM y 48 mg de CalibiosorbTM para absorber

el detergente asociado al enzima. Se lavó finalmente el electrodo con tampón fosfato 0,1 M pH 7.

3.2.7.2.3. Inmovilización covalente de Hasa D. V. Hildenborough en presencia de fosfolípidos

A una superficie de $0,2 \text{ cm}^2$ de oro modificado con 4-ATP se añadió 12 μl de Hasa DvH 27 μM en tampón MES 10 mM, pH 6, 0,1 % DDM, 20 μl de dispersión de liposomas 0,6 mg/ml en tampón MES pH 5 y 48 mg del adsorbente CalbiosorbTM durante 20 min. A continuación se incubó el electrodo en una disolución de ECD 11,6 mM en tampón MES 10 mM pH6 durante 30 minutos. Finalmente se lavó con tampón fosfato 0,1 M pH 7.

Se empleó el mismo procedimiento para modificar los electrodos de hilo de oro.

3.2.8. Inmovilización de enzima lacasa *Trametes hirsuta*

3.2.8.1. Inmovilización mediante enlace amida

Sobre la superficie modificada del electrodo, ya sea de carbono o de oro, con grupos amino, se depositaron 10 μl de disolución de enzima durante 20 min para permitir la difusión de la lacasa a través de los poros del electrodo y su orientación sobre la monocapa de la superficie. A continuación se añadieron 10 μl de una disolución formada por ECD 36 mM y NHS 17 mM en tampón MES 10 mM, pH 6. Se dejó reaccionar durante 2h. De esta manera se activaron los grupos carboxílicos de los residuos glutámicos y aspárticos de la lacasa, favoreciendo la unión covalente de éstos con los grupos amino de la monocapa para formar grupos amida como se representa en la Figura 3.2.5. El electrodo se lavó durante 10 min en el tampón de medida.

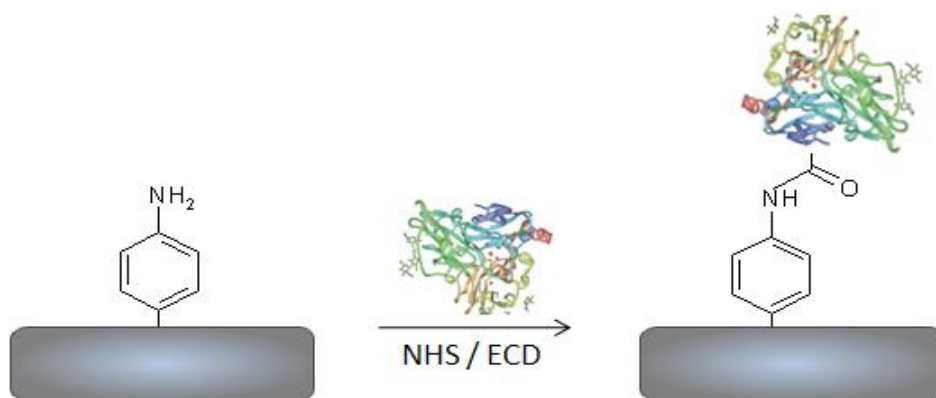


Figura 3.2.5. Inmovilización covalente de lacasa mediante la formación de enlaces amida con los grupos amino de la monocapa en presencia de NHS/ECD.

3.2.8.2. Inmovilización mediante base de Schiff

Se añadieron 55 μl de NaIO_4 10 mg/ml a 5 μl de lacasa 7,5 mg/ml tampón fosfato 100 mM pH 6,5 durante 30 min para oxidar a aldehídos los hidroxilos de los glicosacáridos presentes en la superficie de la enzima (Gupta, G.y col., 2004).

Posteriormente se añadieron 90 μl de Na_2HPO_4 100 mM para aumentar el pH de la disolución enzimática a 7. El electrodo modificado se sumergió en la disolución obtenida durante 90 min para que reaccionaran los grupos amino de la monocapa de los electrodos con los grupos aldehído de la lacasa, para formar enlaces iminas o bases de Schiff. El electrodo se lavó en tampón de medida.

3.2.8.3. Inmovilización mediante base de Schiff y enlace amida

En primer lugar se inmovilizó la lacasa como se describe en el apartado 3.2.8.2. Una vez que se ha formado el enlace imina entre los grupos amino de la monocapa y los azúcares de la enzima, se procedió a la formación de un enlace amida entre los grupos carboxílicos de la enzima y los grupos amino de la monocapa que han quedado sin reaccionar. Para ello se depositaron sobre el electrodo 5 μl ECD 36 mM y 5 μl NHS 17 mM, ambas disoluciones preparadas en tampón MES 10 mM pH 6, durante 2 h y se cubrió el electrodo

con un “eppendorf” para evitar la evaporización. El electrodo se lavó durante 10 min en el tampón de medida (Figura 3.2.6).

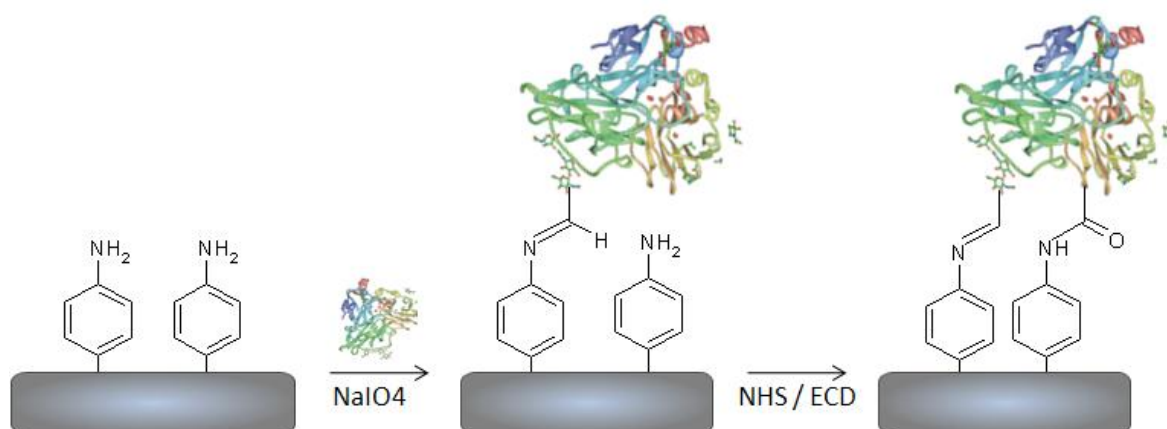


Figura 3.2.6. Etapas desarrolladas para la inmovilización covalente de lacasa en dos etapas sobre electrodos funcionalizados.

3.2.9. Medidas electroquímicas

3.2.9.1. Electrodos modificados con Hidrogenasa

Los experimentos se realizaron en una celda electroquímica de vidrio con cinco orificios, dos de ellos para la entrada y salida de gases, otro para el contra-electrodo (hilo de platino), un cuarto para poder inyectar disoluciones a través de un septum y uno central por donde se introdujo el electrodo de trabajo (rotatorio o estacionario). El electrodo de referencia, saturado de calomelanos (SCE), se colocó en un brazo externo conectado por un capilar de Luggin al compartimento principal, de tal manera que siempre se mantuvo a temperatura ambiente (25 °C). Se usó el factor de corrección $E_{\text{NHE}} = E_{\text{SCE}} + 0,241 \text{ V}$ para convertir los potenciales medidos a valores respecto del potencial normal de hidrógeno, NHE.

La celda se encontraba rodeada con una camisa llena de agua que nos permitió controlar la temperatura del experimento, la cual fue habitualmente 40 °C.

Las medidas se realizaron en el interior de una cámara anaerobia, como se muestra en la foto (Figura 3.2.7), para evitar la presencia de O_2 , ya que concentraciones muy pequeñas de O_2 inactivan la enzima. La cámara

anaerobia estaba equipada con un detector de O_2 , de tal modo que se controló que la concentración de O_2 dentro de la cámara durante los experimentos fuera siempre inferior de 0,1 ppm.

Todos los gases usados, antes de ser borboteados en la celda pasaron a través de un filtro de O_2 .

Las medidas de voltamperometría cíclica se realizaron con un Potenciostato/Galvanostato Autolab barriendo entre -0,8 y 0 V vs SCE a 20 mV/s para los electrodos de carbono modificados, y entre -0,6 y 0 V vs SCE para los electrodos de oro modificados, ya que las SAM de tioles son menos estables y se produce una desorción reductiva a potenciales más negativos que -0,6 V vs SCE.



Figura 3.2.7. Fotografía de una cámara anaerobia.

3.2.9.2. Electrodos modificados con Lacasa

Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo en una celda de vidrio termostatzada a 27 °C que presentaba cuatro bocas, una para el electrodo de referencia de Ag/AgCl, KCl 3 M, otra para el contraelectrodo (hilo de platino), una tercera boca para la entrada de gases y la cuarta para el electrodo de trabajo rotatorio o estacionario.

El tampón de medida fue acetato sódico 50 mM, $NaClO_4$ 100 mM, pH 4,2.

Las medidas de voltamperometría cíclica de los electrodos modificados con lacasa se realizaron entre 1 y 0,2 V vs NHE a una velocidad de barrido de 10 mV/s. Las medidas de cronoamperometría se llevaron a cabo bajo un potencial constante de 0,4 V vs NHE y rotando el electrodo a 500 rpm bajo aire o con un borboteo constante de O₂ en la disolución.

3.2.10. Medidas de AFM, XPS, TEM

Estas medidas se realizaron con los equipos de los Servicios Generales del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica.

3.2.10.1. AFM (Microscopía de Fuerzas Atómicas)

Las medidas se realizaron con un microscopio Agilent 5500, en modo “tapping” en medio líquido. El cantiléver empleado fue Olympus RC800PSA, 200-20 nm. La punta empleada fue de un diametro de 20 nm y una constante de “spring” de 0,15-0,6 N/m.

3.2.10.2. XPS (Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X)

Los análisis elementales de las superficies estudiados se llevaron a cabo con un espectrómetro SPECS GmbH operando en modo de energía constante. Se utilizo una a fuente de emisión de rayos X monocromática de magnesio (1253,6 eV) con una potencia de 100 W y voltaje de 10 kV.

3.2.10.3. TEM (Microscopía de Transmisión Electrónica)

Las imágenes se realizaron en un microscopio Jeol 2100, HRTEM, con módulo EDX. La potencia empleada fue de 200 kV.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, Hidrogenasa

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, Hasa DvH

En este capítulo se ha estudiado la hidrogenasa (Hasa) [NiFeSe] de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (DvH) mediante FTIR para determinar los estados redox del centro activo y el efecto de CO y O₂, inhibidores de la mayoría de hidrogenasas, en la actividad catalítica. En primer lugar, se estudiaron métodos desarrollados en nuestro laboratorio para hidrogenasas solubles de [NiFe], y después se estudió la inmovilización controlada de la enzima sobre electrodos por diferentes estrategias. A partir de dicho estudio, se desarrollaron estrategias específicas para una Hasa de membrana. Para ello se incorporaron a los electrodos bicapas fosfolípidicas y monocapas de Hasa de forma controlada, de modo que la hidrogenasa de membrana mantuviera su conformación más activa, es decir manteniendo su cadena hidrofóbica, pero con el objetivo adicional de la orientación adecuada para la TED (transferencia electrónica directa) entre la enzima y el electrodo.

4.1. Purificación de la hidrogenasa de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

La bacteria *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (DvH) produce varias hidrogenasas muy activas que catalizan reversiblemente la reacción de oxidación o producción de hidrógeno. Cuando el microorganismo es cultivado en presencia de Se expresa preferentemente la Hasa de [NiFeSe], la cual tiene gran interés biotecnológico (Valente, F.y col., 2005). Esta Hasa fue purificada en el laboratorio de la Prof. Inês A. C. Pereira del Instituto de Tecnología Química e Biológica, Oeiras, Portugal, durante una estancia corta en dicho laboratorio.

Las células de DvH fueron crecidas a 37 °C, anaeróbicamente y en medio lactato/sulfato como lo describe LeGall y cols (LeGall, J.y col., 1994). Se partió de 230 g de células totales, que mediante sucesivas centrifugaciones dieron lugar a 135 ml de la fracción de membrana. La metodología de preparación del

extracto de membrana se realizó siguiendo el esquema descrito en Materiales y Métodos, apartado 3.2.4.1 (Valente, F.y col., 2005).

Todo el procedimiento de la purificación se realizó a pH 7,6 y 4 °C, en presencia del detergente Zwittergent 3-12 al 0,2 % (w/v). Para lo cual se siguió el protocolo descrito previamente por Valente y cols (Valente, F.y col., 2005). La purificación del extracto se llevó a cabo en columnas cromatográficas de intercambio iónico con un gradiente lineal de 0 a 400 mM NaCl. En función del perfil cromatográfico obtenido se agruparon las muestras en fracciones como se indica en la Figura 4.1.1.

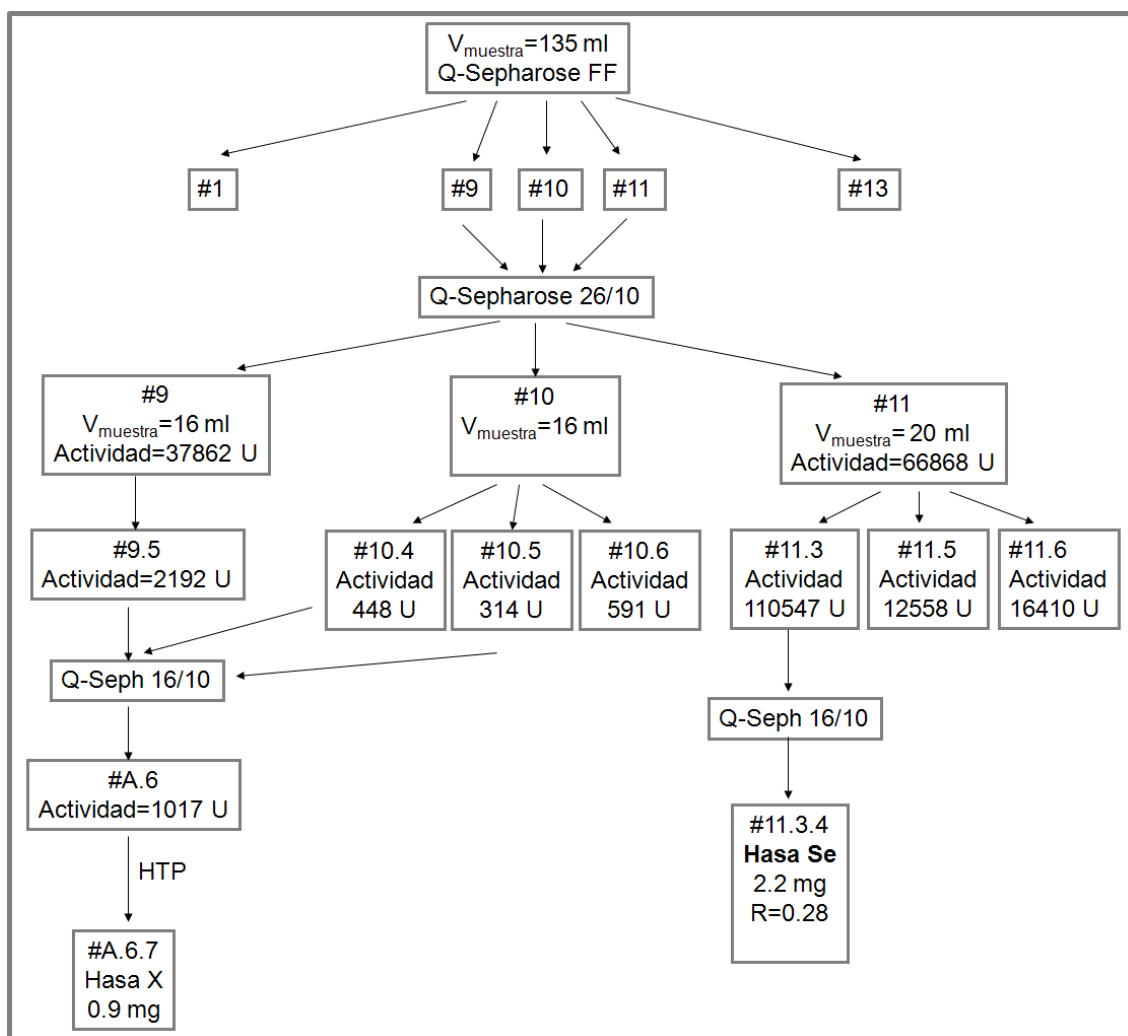


Figura 4.1.1. Etapas seguidas durante la purificación de la Hasa DvH.

Las fracciones que presentaron actividad hidrogenasa se concentraron por ultrafiltración. Para confirmar la presencia de la misma se realizaron geles SDS o nativo, como los que se indican en las Figuras 4.1.2 y 4.1.3.

El extracto de gel SDS realizado muestra que la Hasa *DvH* se ha purificado, ya que aparecen dos bandas correspondientes a las dos subunidades de la enzima, de 35 y 63 kDa (Figura 4.1.2).

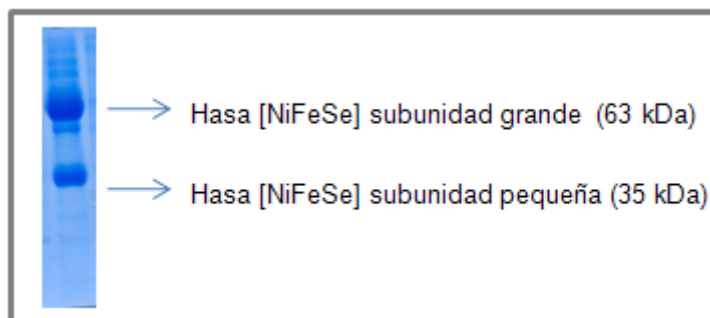


Figura 4.1.2. Gel SDS teñido con azul de Coomassie. Bandas asignadas a las dos subunidades de la hidrogenasa $[\text{NiFeSe}]_{\text{membrana}}$.

El gel nativo, mostrado en la Figura 4.1.3, revela que la Hasa $[\text{NiFeSe}]_{\text{membrana}}$ presenta actividad de producción de H_2 (carril 4), y que es similar a la obtenida con la misma Hasa purificada anteriormente y utilizada como referencia (carril 3). En el mismo gel se añadieron como referencias adicionales la hidrogenasa $[\text{NiFeSe}]_{\text{soluble}}$ (carril 1) y la Hasa $[\text{NiFe}]$ (carril 2). Se puede observar la considerable diferencia en la migración entre la forma soluble y la de membrana de la Hasa $[\text{NiFeSe}]$, indicando la alta actividad que presenta esta última. La diferencia entre ambas conformaciones de la Hasa se debe a la presencia en la de membrana, de una cadena hidrofóbica en la subunidad pequeña. La alta actividad de la Hasa $[\text{NiFeSe}]_{\text{membrana}}$ va asociada a la presencia de la misma (Valente, F. y col., 2005).

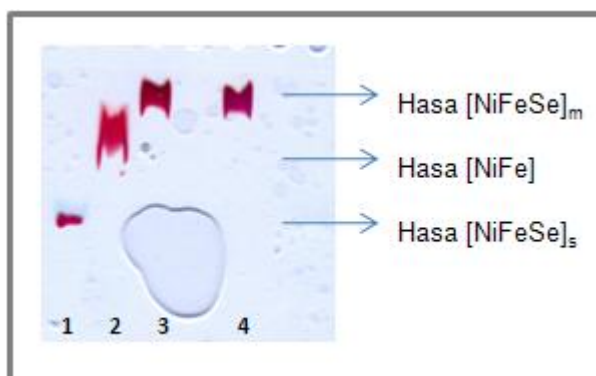


Figura 4.1.3. Gel nativo para la detectar Hasa *Dv*. 1) Hasa $[\text{NiFeSe}]_{\text{soluble}}$. 2) Hasa $[\text{NiFe}]$. 3) y 4) Hasa $[\text{NiFeSe}]_{\text{membrana}}$.

Finalmente, la cantidad de Hasa [NiFeSe]_{membrana} (Hasa DvH) purificada obtenida fue 2,2 mg.

4.2. Caracterización por FTIR

Una vez purificada la Hasa DvH se procedió a caracterizarla por FTIR al igual que se ha hecho previamente para otras hidrogenasas (De Lacey, A. L. y col., 2007a). El centro activo de las hidrogenasas [NiFeSe], como se muestra en la Figura 4.2.1, presenta un ligando CO y dos CN⁻ coordinados al átomo de Fe, los cuales dan lugar a bandas claramente observables en el espectro infrarrojo entre 2150 y 1900 cm⁻¹. En el espectro de las hidrogenasas de [NiFe] se observa una banda para el CO, que es más intensa y aparece a frecuencias en torno a (1900-1950) cm⁻¹, y dos bandas acopladas vibracionalmente para los CN⁻, las cuales son de menor intensidad y aparecen a frecuencias en torno a (2050-2100) cm⁻¹, para cada uno de los estados redox del centro activo (De Lacey, A. L. y col., 2007a).

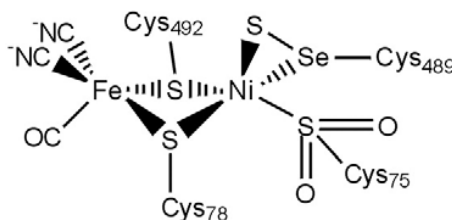


Figura 4.2.1. Representación del centro activo Hasa [NiFe]. Cys-S corresponde a un aminoácido cisteína y Se-Sec a una selenocisteína.

El espectro a de la Figura 4.2.2a corresponde al realizado a la muestra de Hasa DvH tal como se aísla en presencia de O₂, por lo cual al estado redox del centro activo de la Hasa DvH lo denominaremos Ni-IS. Muestra dos bandas a 1904 y 1936 cm⁻¹, que son frecuencias características de los ligandos CO coordinados al Fe. Aparecen también tres bandas a frecuencias mayores (a 2079, 2085 y 2094 cm⁻¹) en la región de los ligandos CN⁻. En otros espectros realizados para el mismo estado pero de lotes diferentes de hidrogenasa también aparece otra banda a 2076 cm⁻¹. Además, la intensidad relativa entre

las diferentes bandas del espectro varía de un lote de enzima a otro. Esto sugiere que la Hasa *DvH* presenta dos isoformas en el centro activo, las cuales llamaremos Ni-IS_I y Ni-IS_{II}. Esta interpretación está de acuerdo con la estructura cristalográfica de la Hasa *DvH* aislada aeróbicamente, en la que hay más de una conformación para el centro activo (Marques, M. C. y col., 2010). Las frecuencias de las bandas asignadas a los estados Ni-IS_I y Ni-IS_{II} se muestran en la Tabla 4.2.1.

La misma muestra de Hasa *DvH* se incubó bajo 1 atm de H₂ durante 10 minutos para obtener el espectro b (Figura 4.2.2b), que corresponde al estado Ni-R, es decir al centro activo completamente reducido, cuyas bandas se muestran en la Tabla 4.2.1. En este estado redox la Hasa *DvH* está activa completamente (De Lacey, A. L. y col., 2007a). Cuando la muestra reducida se reoxidó al aire no se obtuvo el estado inicial, Ni-IS, ya que las frecuencias de las bandas medidas son completamente diferentes (Figura 4.2.2c). A este nuevo estado oxidado llamamos NI-OX, (Tabla 4.2.1). Este comportamiento es diferente al de las hidrogenasas [NiFe], porque éstas últimas al reoxidarse al aire dan los mismos estados oxidados del inicio.

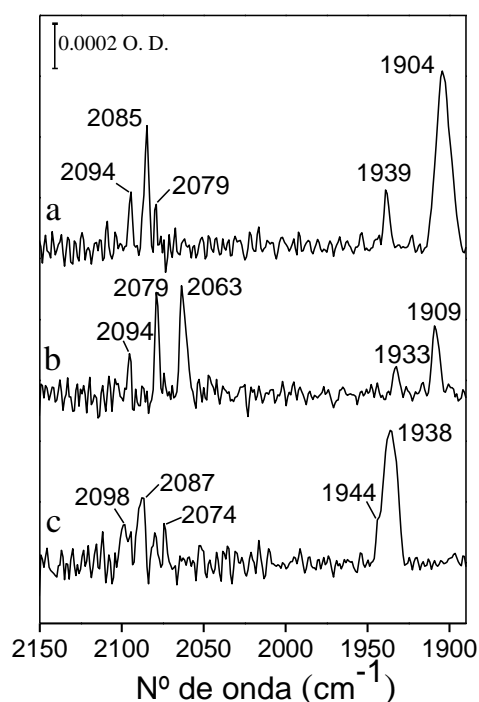


Figura 4.2.2. Espectros de FTIR de Hasa *DvH* 0,12 mM; a) como se aísla en condiciones aeróbicas; b) estado reducido bajo 1 atm de H₂; c) reoxidada con aire.

Para poder detectar todos los estados redox del centro activo y determinar los potenciales formales redox de los diferentes equilibrios, se realizaron experimentos con una celdilla FTIR-espectroelectroquímica. Esta celdilla permite hacer espectros de infrarrojo bajo control electroquímico (De Lacey, A. L. y col., 1997).

Se hizo un espectro partiendo de la muestra en el estado Ni-IS, que tras aplicar un potencial de -400 mV se transformó en Ni-R. La conversión fue rápida, al contrario de lo que ocurre en las hidrogenasas [NiFe], en las que hay un largo proceso de activación dependiente de la temperatura (De Lacey, A. L. y col., 1997) (De Lacey, A. L. y col., 2005). Tras cambiar el potencial de -450 a -250 mV se obtuvo el estado Ni-C (Figura 4.2.3), que es un estado activo parcialmente reducido en todas las hidrogenasas de [NiFe] y que es detectado por EPR (Resonancia Paramagnética de Electrón), ya que el centro activo está en el estado Ni^{3+} (He, S. H. y col., 1989) (Sorgenfrei, O. y col., 1996) (Valente, F. y col., 2005). En el estado Ni-C las bandas correspondientes al ligando CO aparecen a 1900 y 1915 cm^{-1} , y las de los ligandos CN^- se observan a 2068, 2083 y 2094 cm^{-1} . Los estados reducidos, Ni-C y Ni-R se encuentran en equilibrio redox, el cual corresponde a la conversión de Ni^{2+} del estado Ni-R, que es EPR silencioso, a Ni^{3+} del Ni-C, detectado por EPR, como ocurre en las hidrogenasas [NiFe] (De Lacey, A. L. y col., 2007a).

Cuando se aplicaron potenciales positivos (+200 mV vs NHE) a la celda espectroelectroquímica no se obtuvo ningún estado oxidado, pero después de 18 horas con potencial a circuito abierto y entrada gradual de O_2 , sí que se obtuvo el estado Ni-OX. Luego, este estado sólo se obtiene a través de la oxidación aeróbica de Ni-R ó Ni-C.

Cuando se aplicó un potencial de -300 mV vs NHE al estado Ni-OX se obtuvo un estado transiente (Ni-TR) (Figura 4.2.3) con una banda a 1925 cm^{-1} asignada al CO, y dos bandas a 2078 y 2092 cm^{-1} asignadas a los CN^- . Manteniendo el mismo potencial unos minutos más, se obtuvo el estado activo Ni-C, ya descrito.

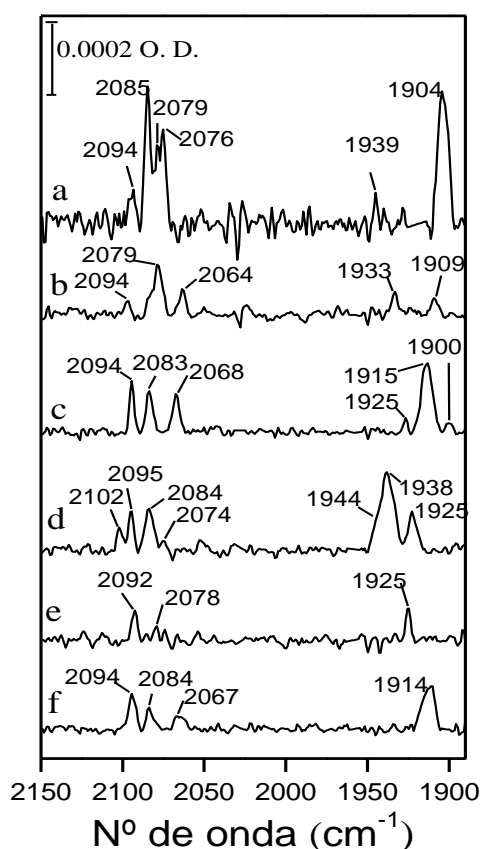


Figura 4.2.3. Espectro de FTIR de Hasa DvH 1 mM en una celda espectroelectroquímica bajo diferentes condiciones redox. a) como se aísla, potencial de reposo +300 mV; b) reducida aplicando un potencial de -435 mV; c) reoxidada a -250 mV; d) toda la noche a circuito abierto; e) reducida durante 10 min a -300 mV; f) reducida durante 20 min a -300 mV.

En la Figura 4.2.4 se muestra un esquema con los diferentes estados redox de la Hasa DvH detectados por FTIR. En la Tabla 4.2 se detallan los valores de las frecuencias de las bandas de los ligandos CO y CN^- correspondientes a las isoformas de cada estado redox. Los signos de interrogación corresponden a las bandas que no fueron detectadas para la isoforma II.

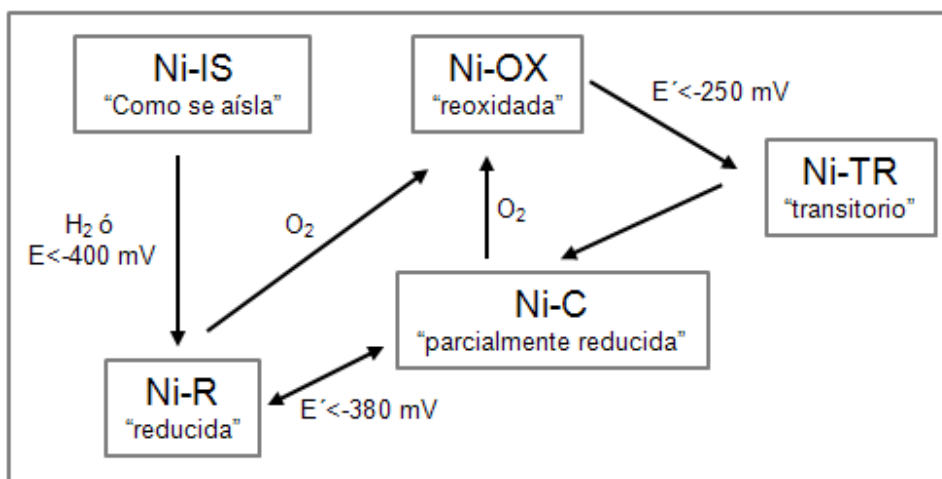


Figura 4.2.4. Esquema de los estados redox de Hasa *DvH*.

Desconocemos cual es la diferencia estructural entre los dos estados oxidados del centro activo de la Hasa *DvH*, ya que solo se ha reportado la estructura cristalográfica de la Hasa en el estado Ni-IS (Marques, M. C. y col., 2010). Sin embargo, podría ser que la cisteína 75 del centro activo, que en el estado Ni-IS se encuentra totalmente oxidada a sulfinato (Figura 4.2.1), solo estuviera parcialmente oxidada a sulfenato en el estado Ni-OX, ya que la reactivación de Ni-OX requiere condiciones menos reductoras que Ni-IS (Figura 4.2.4). Alternativamente, podría ser que el ligando oxidado en Ni-OX fuera la selenocisteína y no la cisteína 75.

Los estados reducidos de la Hasa *DvH*, Ni-C y Ni-R, sí pueden ser comparados con los de las Hasa [NiFe], ya que una vez activadas, las estructuras de los centros activos de las Hasas [NiFeSe] y [NiFe] son muy similares (Garcin, E. y col., 1999).

Los espectros de FTIR se realizaron a diferentes valores de pH, entre 6 y 8, sin encontrarse cambios en los espectros, por lo que las dos isoformas que aparecen no se deben a diferentes niveles de protonación de algún aminoácido cercano al centro activo (De Lacey, A. L. y col., 1997).

ESTADOS REDOX	ISOFORMA I		ISOFORMA II	
	$\nu(\text{CO})$ (cm ⁻¹)	$\nu(\text{CN}^-)$ (cm ⁻¹)	$\nu(\text{CO})$ (cm ⁻¹)	$\nu(\text{CN}^-)$ (cm ⁻¹)
Ni-IS	1.904	2.076, 2.085	1.939	2.079, 2.094
Ni-OX	1.938	2.084, 2.095	1.944	2.074, 2.102
Ni-TR	1.925	2.078, 2.092	?	?
Ni-C	1.915	2.083, 2.094	1.900	2.068, ?
Ni-R	1.933	2.064, 2.079	1.909	2.064, 2.079
Ni-CO	1,933			

Tabla 4.2.1. Tabla con los valores de frecuencias asignadas a los diferentes estados de la Hasa DvH.

Podemos observar que las frecuencias de las bandas de CO son más bajas que para las Hasas [NiFe], ya que éstas presentan un átomo de azufre coordinado a la cisteína en lugar del átomo de selenio que posee la Hasa DvH (De Lacey, A. L.y col., 2007b). El selenio es menos electronegativo que el azufre, por lo que se producirá un aumento de la donación π de los orbitales del selenio a los orbitales $2p\pi^*$ del ligando CO. Estos orbitales son antienlazantes y el aumento de densidad electrónica en ellos disminuye la fortaleza del enlace CO. En consecuencia, la frecuencia de las bandas disminuye (Nakamoto, K., y col., 1997).

También se detecta que las intensidades de las bandas de CO y CN^- son comparables, al contrario que en las Hasas [NiFe], lo cual indica que existe una alta movilidad electrónica en los ligandos CN^- , permitiendo que formen puentes de hidrógeno con aminoácidos cercanos (Darensbourg, M. Y.y col., 2000) (De Lacey, A. L.y col., 2003)

Se estudio por FTIR el efecto que el CO extrínseco, inhibidor de la mayoría de hidrogenasas (De Lacey, A. L.y col., 2007a), provoca en el centro activo de la Hasa DvH. Para lo cual se realizaron medidas en primer lugar a la enzima tal como se aísla, obteniendo el espectro del estado Ni-IS. Posteriormente, se activó la enzima bajo H_2 durante 10 min y se reemplazó el H_2 por CO o por ^{13}CO y se midieron los espectros FTIR que se muestran en la Figura 4.2.5.

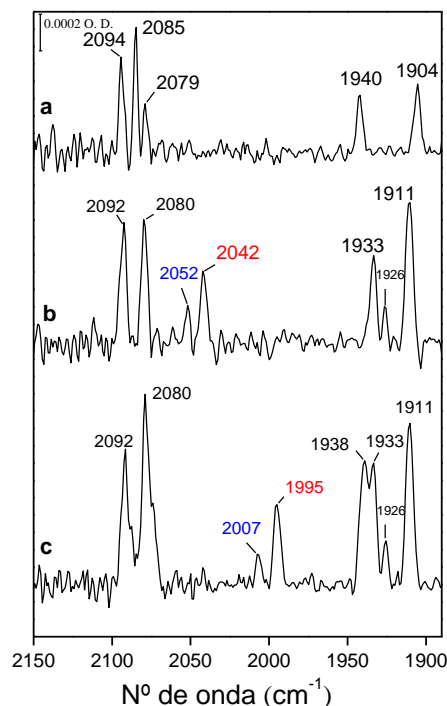


Figura 4.2.5. Espectros FTIR de Hasa *DvH* 0,2 mM. a) aislada aeróbicamente; b) reducida bajo 1 atm de H_2 y luego bajo 1 atm de CO; c) o bajo 1 atm de ^{13}CO . Las frecuencias de las bandas asignadas al CO extrínseco se marcan en azul (isoforma I) y rojo (isoforma II).

Se observa en el espectro b (Figura 4.2.5), realizado a la Hasa *DvH* en presencia de CO, dos bandas adicionales a 2052 y 2042 cm^{-1} . Estas dos bandas se desplazan cuando se incubó la muestra con el isótopo ^{13}CO . La variación en las frecuencias de estas bandas a 2007 y 1995 cm^{-1} respectivamente corresponde con el valor teórico esperable para el cambio isotópico en el monóxido de carbono (Nakamura, C.y col., 1998). Por lo tanto, estas dos bandas se pueden asignar al CO extrínseco unido a cada una de las conformaciones del centro activo. El hecho de que las bandas del CO intrínseco e extrínseco no estén acopladas (el intercambio isotópico del CO extrínseco no afecta a las frecuencias vibracionales de los ligandos intrínsecos), sugiere que el CO extrínseco se une al Ni en lugar de al Fe. Llamaremos a este estado Ni-CO. En la Tabla 4.2.2 se resumen los valores de las frecuencias asignados a los diferentes estados del centro activo con el inhibidor CO unido.

En el espectro c (Figura 4.2.5) aparece una banda a 1938 cm^{-1} , que no aparecía en el espectro de Ni-CO, pero muy probablemente es debido a que hubiera entrado algo de aire en la muestra durante el proceso de reemplazar el

H₂ por ¹³CO, ya que la frecuencia coincide con la frecuencia de CO intrínseco del estado Ni-OX.

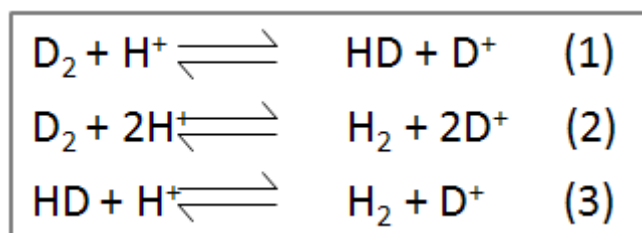
El CO extrínseco solo se coordinó al centro activo de la Hasa DvH cuando había sido previamente reducida, es decir no se une a las formas oxidadas del centro activo.

ESTADOS REDOX	ISOFORMA I		ISOFORMA II	
	$\nu(\text{CO})$ (cm ⁻¹)	$\nu(\text{CN}^-)$ (cm ⁻¹)	$\nu(\text{CO})$ (cm ⁻¹)	$\nu(\text{CN}^-)$ (cm ⁻¹)
Ni-CO	1.933, 2.052 (COext)	2.081, 2.094	1.911, 2.042(Coext)	2.080, 2,092
Ni- ¹³ CO	1.933, 2.007 (COext)	2.081, 2.094	1.911, 1.995(Coext)	2.080, 2,092

Tabla 4.2.2. Tabla con los valores de frecuencias asignadas a los diferentes estados de la Hasa DvH en presencia de CO.

4.3. Efecto de inhibición de Hasa DvH por CO y O₂. Medidas de actividad catalítica mediante espectrometría de masas

Además de la oxidación y producción de H₂, las hidrogenasas son capaces de catalizar la reacción de intercambio isotópico D⁺/H⁺ mediante las siguientes reacciones:



La ruptura heterolítica del D₂ en el centro activo de la hidrogenasa da lugar a un D⁻, que se coordina entre ambos metales del centro activo, y un D⁺ que se intercambia con los protones del medio. Como la acción catalítica de las hidrogenasas es reversible, la Hasa libera al medio HD a través del canal de gases por recombinación del D⁻ del centro activo con un H⁺ (reacción 1). El HD liberado al medio puede activarse de nuevo en el centro activo de la Hasa y por una segunda reacción de intercambio producir H₂ (reacción 3). Más aún, se ha comprobado experimentalmente que las hidrogenasas son capaces también de

catalizar el doble intercambio isotópico sin liberar el intermedio HD (reacción 2) (Vignais, P. M., 2005).

La actividad de intercambio isotópico de las hidrogenasas se puede seguir por espectrometría de masas, ya que esta técnica permite medir simultáneamente la cinética de evolución de los diferentes isótopos de la reacción (Cammack, R. y col., 1994).

Se realizaron medidas de la actividad de intercambio isotópico de la Hasa DvH para evaluar el efecto de inhibición del CO y el O₂. Estos compuestos son inhibidores habituales de las hidrogenasas y suponen un inconveniente para sus aplicaciones biotecnológicas (De Lacey, A. L. y col., 2007a). Para ello se midió la actividad de intercambio isotópico D⁺/H⁺ mediante espectrometría de masas tal como se describe en Materiales y Métodos (apartado 3.2.3.2). Mediante esta técnica podemos detectar la presencia de los diferentes gases y medir cinéticas en tiempo real, como en la Figura 4.3.1. En esta figura se observa durante el ensayo de actividad catalítica la evolución de los gases con masas 2 (H₂), 3 (HD), 4 (D₂) y 28 (CO).

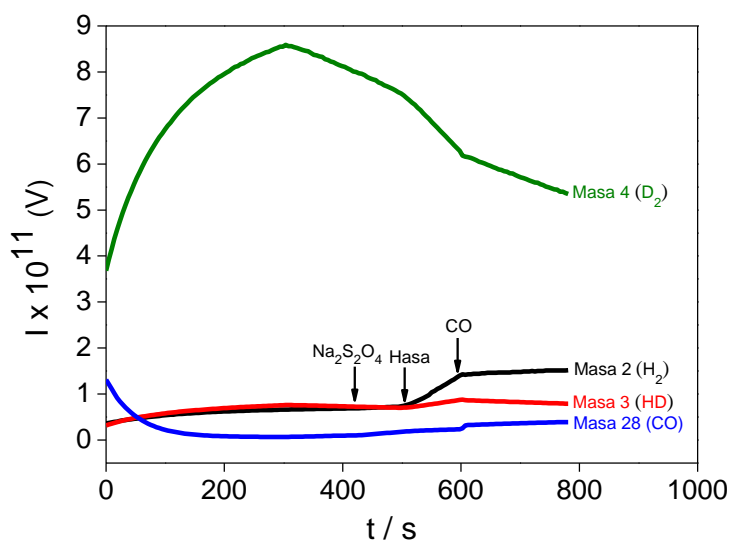


Figura 4.3.1. Actividad de intercambio isotópico de Hasa DvH medida mediante espectrometría de masas. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 20 mM saturado con D₂ al 20 % y N₂ al 80 %. Se añadió en el reactor de medida ditionito sódico 0,1 M, 0,2 µg de Hasa DvH y CO 10 µM en los tiempos marcados por flechas.

En primer lugar, se observa en la Figura 4.3.1 un aumento de la masa 4 debido al borboteo de D₂ en el reactor hasta la saturación. Al retirar el borboteo

y cerrar herméticamente la celda sin dejar fase gaseosa mediante un émbolo, se observa que comienza a disminuir el D_2 debido a que difunde a través de la membrana de teflón hacia el espectrofotómetro por la diferencia de presiones (el espectrómetro de masas está en condiciones de alto vacío). A continuación se añadió ditionito sódico para eliminar el O_2 residual y 90 min después se añadió Hasa *DvH*. Inmediatamente, después de añadir Hasa *DvH* se observa cómo comienza la producción de HD e H_2 , y cómo aumenta la pendiente de la curva de consumo de D_2 debido a la actividad de intercambio D^+/H^+ de la Hasa *DvH*. Se observa además que la velocidad de producción del doble intercambio es más rápida que la de intercambio sencillo, como ocurre con otras hidrogenasas de [NiFeSe] (Berlier, Y.y col., 1987) (Vignais, P. M.y col., 2002). Cuando se añadió CO 10 μ M en el reactor de medida, la masa 28 aumenta y se detiene automáticamente la producción de H_2 (masa 2) y HD (masa 3). Por lo tanto, la actividad de intercambio isotópico D^+/H^+ de Hasa *DvH* se inhibe completamente en presencia de CO. Este resultado era de esperar debido a que la constante de inhibición para el CO, $K_{i,CO}$ medida para varias Hasas de [NiFeSe] es muy baja (Berlier, Y.y col., 1987). Además, este efecto de inhibición catalítica está de acuerdo con los resultados de FTIR del apartado anterior, en los que se detectó la unión de CO extrínseco al centro activo de la Hasa *DvH*.

Se estudió también el efecto que provoca el O_2 en la actividad de intercambio D^+/H^+ de la Hasa *DvH*, del mismo modo que se realizó para el CO (Figura 4.3.2). Se observó que la actividad catalítica de Hasa *DvH* no comenzó hasta que se añadió ditionito sódico. Esto ocurre porque los estados oxidados de la Hasa *DvH* son inactivos, teniendo que añadir un reductor para activar la enzima y formar los estados Ni-R y Ni-C. En la Figura 4.3.2 se puede observar que la actividad catalítica comienza nada más añadir el reductor, que es un comportamiento cinético típico de las Hasas de [NiFeSe] y que las distingue de las de [NiFe] (De Lacey, A. L.y col., 2007a).

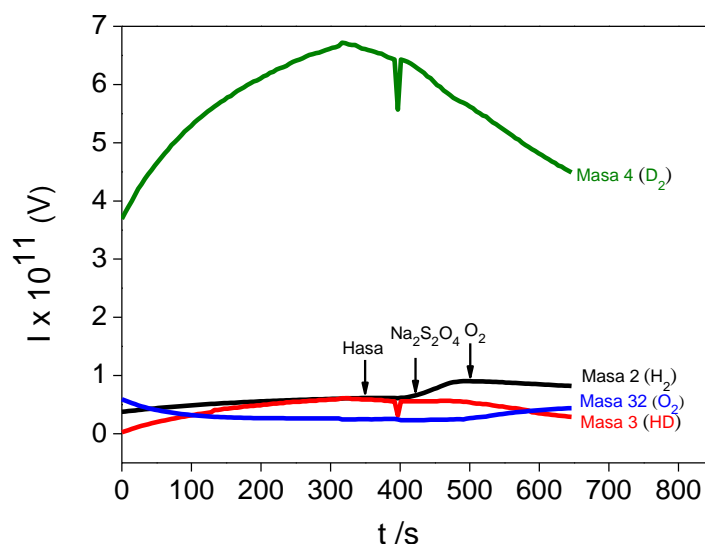


Figura 4.3.2. Medidas de actividad de intercambio de Hasa *DvH*. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 20 mM saturado con D_2 al 20 % y N_2 al 80 %. Se añadió en el reactor de medida ditionito sódico 0,1 M, 0,2 μg de Hasa *DvH* y O_2 10 μM .

Se observa en la Figura 4.3.2, que al añadir O_2 10 μM , se detiene completamente la actividad de intercambio isotópico. Por lo tanto, la Hasa *DvH* oxidada no es capaz de catalizar la reacción. Esta inhibición por O_2 se ha descrito también para la actividad de oxidación de H_2 de la Hasa [NiFeSe] de *D. baculatum* (Parkin, A.y col., 2008).

4.4. Inmovilización de Hasa *DvH* sobre electrodos de carbono

Se estudió primero la inmovilización de la Hasa *DvH* sobre electrodos de carbono mediante un método puesto a punto anteriormente en el laboratorio para la unión covalente y orientada de la Hasa [NiFe] de *D. Gigas* (Rudiger, O.y col., 2005). Se emplearon electrodos de carbono HOPG “edge” para inmovilizar Hasa *DvH*. El diámetro de estos electrodos es 0,5 cm, y por tanto presentan un área geométrica de 0,196 cm^2 . Se empleó HOPG “edge” en lugar de “basal” ya que presenta una menor resistencia a la transferencia de carga por lo cual facilita las reacciones electroquímicas para modificar su superficie y la transferencia electrónica directa (TED) entre Hasa y electrodo (McCreery, R. L., 2008).

4.4.1. Modificación del electrodo de carbono con sal de diazonio 4-nitrofenilo

Para poder inmovilizar covalentemente la Hasa DvH, se modificaron previamente los electrodos de HOPG “edge” mediante la reducción electroquímica de la sal de diazonio 4-nitrofenilo (Rudiger, O.y col., 2005). Se ha estudiado el número de ciclos de voltamperometría adecuados y la concentración de la sal de diazonio para minimizar la formación de multicapas sobre el electrodo durante el proceso electroquímico (Rudiger, O., 2009). Si se aumenta demasiado el recubrimiento en el electrodo con el derivado de la sal de diazonio, la película orgánica depositada puede llegar a adquirir un carácter aislante (Ortiz, B.y col., 1998) (Downard, A. J.y col., 2001), pasivando el electrodo (Allongue, P.y col., 1997), e impedir la transferencia electrónica entre la enzima y el electrodo.

Las condiciones establecidas para modificar los electrodos fueron dos ciclos de voltamperometría cíclica entre 0,75 y 0 V vs Ag/AgCl a 0,2 V/s con sal de diazonio 4-nitrofenilo 2 mM, como se muestra en la Figura 4.4.1.

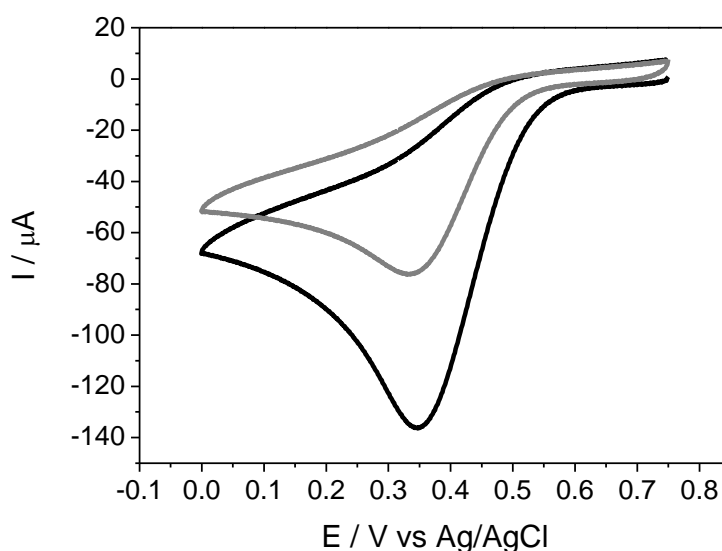


Figura 4.4.1. Modificación de electrodo de carbono HOPG “edge” con sal de diazonio 4-nitrofenilo 2 mM en CH₃CN, Bu₃NBF₄ 0,1M. El primer ciclo de voltamperometria se representa en color negro y el segundo en color gris. La velocidad de barrido empleada fue 200 mV/s.

En los voltamperogramas representados se aprecia el pico de reducción de la sal de diazonio sobre el electrodo y cómo en el segundo ciclo, a medida que el electrodo se va recubriendo con grupos 4-nitrofenilo (HOPG-ArNO₂), la intensidad de corriente de pico disminuye (Pinson, J. y col., 2005).

4.4.2. Reducción de HOPG-ArNO₂ a HOPG-ArNH₂

Los grupos nitro introducidos en la superficie del electrodo se redujeron electroquímicamente a grupos amino, como se indica en el apartado 3.2.6.1.3 de Materiales y Métodos, mediante dos ciclos de voltamperometría cíclica a 0,2 V/s, realizados entre 0 y -1,4 V vs Ag/AgCl.

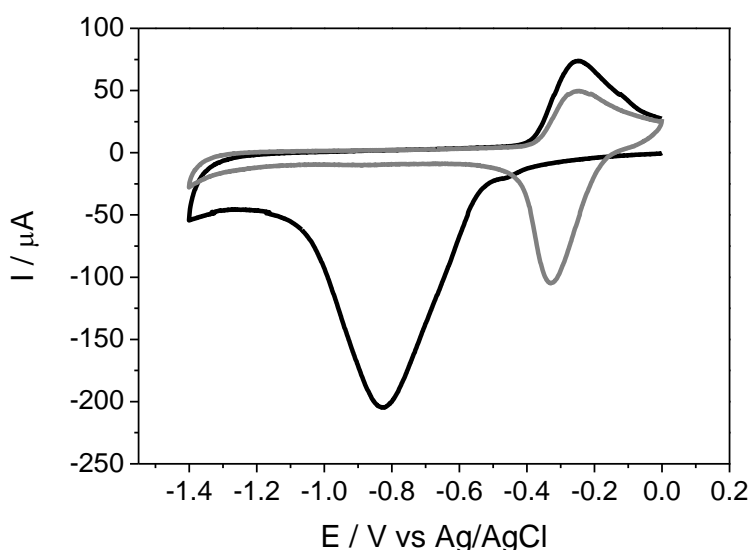
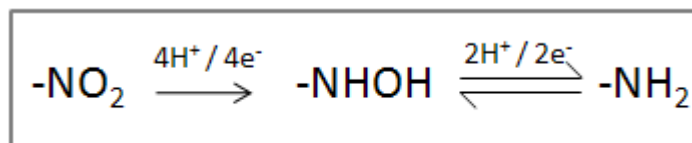


Figura 4.4.2. Reducción electroquímica de HOPG-ArNO₂ a HOPG-ArNH₂. Voltamperometría cíclica realizada a 0,2 V/s en EtOH/H₂O 1:9, KCl 0,1 M. La línea negra corresponde al primer ciclo, y la gris al segundo ciclo.

En el primer ciclo (Figura 4.4.2, color negro) se observa un pico muy intenso a -0,82 V que corresponde a la reducción de los grupos nitro, y en el segundo ciclo se observa una señal redox reversible aproximadamente a -0,3 V. Este proceso corresponde al equilibrio redox ArNHOH/ArNO. Aparece en el segundo ciclo debido a que la reducción de los grupos nitro a amino ocurre en dos etapas, una primera reducción a hidroxilaminas y posteriormente una segunda reducción a aminos. Esta segunda reducción a grupos amino no es

total, sino que una porción de grupos hidroxilamina permanece como tal, debido a la limitación cinética en el aporte de protones (Brooksby, P. A. y col., 2004):



4.4.3. Inmovilización de Hasa DvH sobre los electrodos HOPG-ArNH₂

Para obtener TED entre el electrodo modificado y la enzima, es importante orientar la enzima adecuadamente sobre el electrodo. La transferencia de electrones de las hidrogenasas con su aceptor fisiológico, el citocromo *c*₃ Tpl (Pereira, I. A. C. y col., 1998), sucede a través del “cluster” distal [4Fe4S], que en la Hasa DvH se encuentra en el extremo contrario a la cadena hidrofóbica (Marques, M. C. y col., 2010). En nuestro caso el aceptor de electrones es el electrodo, por lo que la región del “cluster” distal [4Fe4S] debería estar próxima a la superficie del electrodo modificado para obtener TED. En varias hidrogenasas de [NiFe] el “cluster” [4Fe4S] distal, se encuentra rodeado de residuos glutámicos que aportan cargas negativas. Debido a estos residuos y otros en el exterior de la Hasa [NiFe] de *Desulfovibrio gigas* (Hasa D. gigas), aparece un momento dipolar de 564 Debyes con el polo negativo situado en el “cluster” [4Fe4S] distal. Este momento dipolar ha servido para orientar esta Hasa por interacciones electroestáticas sobre un electrodo HOPG-ArNH₂ a pH 6.0 y obtener TED (Rudiger, O. y col., 2005). El pK_a de la monocapa está próximo a 6,9 (Bryant, M. A. y col., 1993), por lo que a ese pH la superficie del electrodo está protonada y la Hasa se orienta con su “cluster” [4Fe4S] distal hacia la superficie del electrodo debido a las interacciones electroestáticas (Rudiger, O. y col., 2005).

Estos resultados se pueden extrapolar a la Hasa DvH, ya que presenta una distribución de cargas en la superficie similar a la de la Hasa D. gigas, como se muestra en la Figura 4.4.3. De este modo, se depositó una disolución de Hasa DvH a pH 6.0 sobre el electrodo modificado para orientar a la Hasa

DvH con su “cluster” [4Fe4S] distal hacia la superficie del electrodo mediante interacciones electroestáticas.

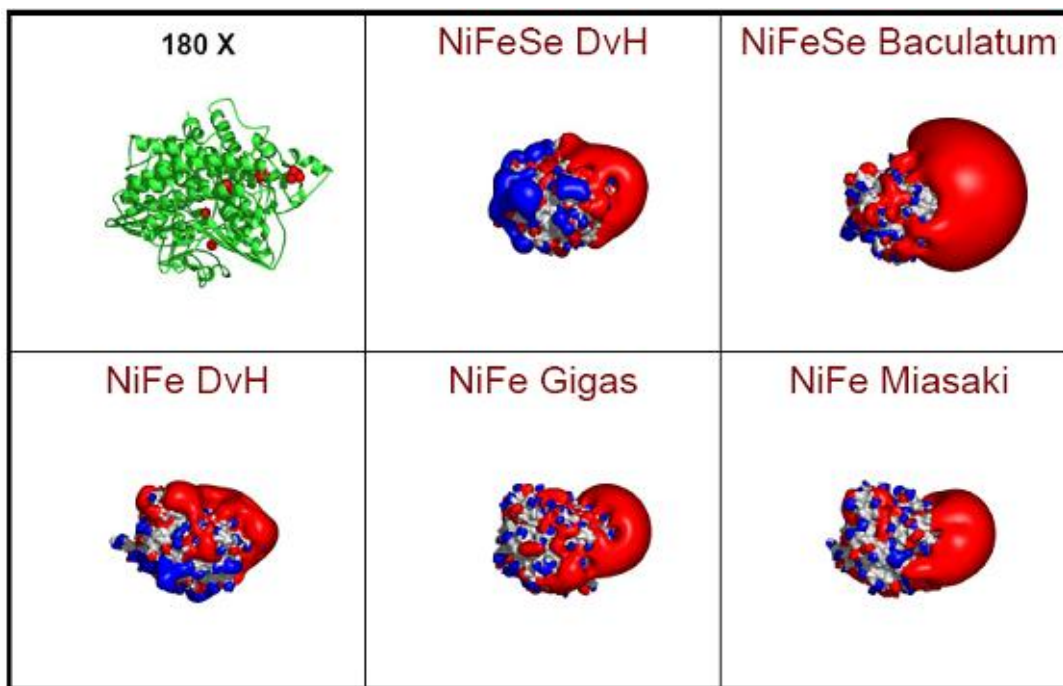


Figura 4.4.3. Superficies 3D de diferentes hidrogenasas. En rojo se representa la superficie con cargas negativas y en azul con cargas positivas. Las Hasas representadas son: Hasa DvH [NiFeSe], *Desulfomicrobium baculatum* [NFeSe], *Desulfovibrio Hildenborough* [NiFe], *D. gigas* [Ni-Fe] y *D. vulgaris* Miyazaki [Ni-Fe]. Esta figura se ha obtenido de la referencia (Rüdiger, O.y col., 2010).

Posteriormente, se formaron enlaces amida entre los grupos carboxilos de la Hasa y los aminos del electrodo debido a los activadores NHS/ECD, como está descrito en el apartado de Materiales y Métodos 3.2.4.1.

Una vez modificado el electrodo con Hasa DvH, se introdujo en la cámara anaerobia. Es fundamental trabajar en condiciones estrictamente anaerobias para poder medir la actividad catalítica de la hidrogenasa, ya que se inhibe con concentraciones bajas de O₂, como se ha comprobado en el apartado 4.3.

Las propiedades electrocatalíticas de la Hasa DvH inmovilizada se estudiaron por voltamperometría cíclica. Primero se realizó la medida en una atmósfera de N₂ y luego se activó la enzima inmovilizada tras borboteo de H₂ en la celda electroquímica durante 15 minutos. En la Figura 4.4.4 podemos apreciar en los voltamperogramas realizados la señal reversible de las hidroxilaminas a un potencial de 0 V vs NHE (Brooksby, P. A.y col., 2004). Este proceso redox no

participa en el proceso electroenzimático de oxidación de H_2 , ya que en el control realizado bajo N_2 también aparece. No obstante, la adición de H_2 durante tiempos significativos causa la reducción gradual de las hidroxilaminas a aminas, lo que conlleva una disminución gradual de este par redox (Rudiger, O., 2009).

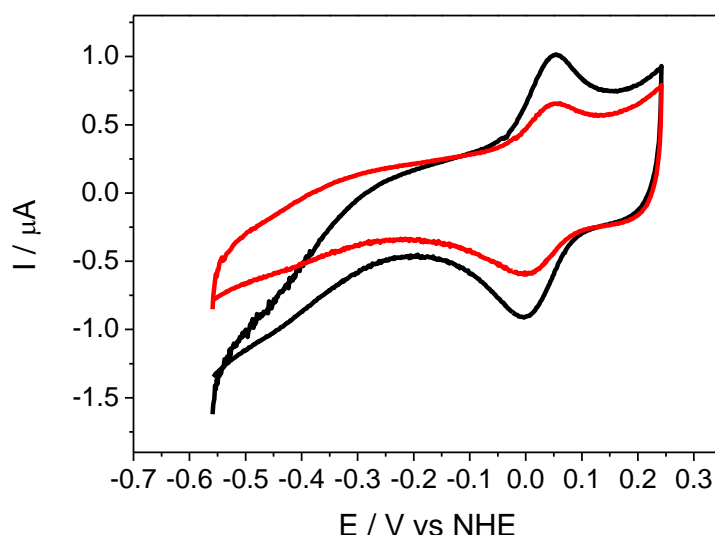


Figura 4.4.4. Voltamperogramas cíclicos de un electrodo rotatorio HOPG-ArNH₂-Hasa DvH. La medida se realizó en tampón fosfato 0,1 M, pH 7, 0,2 % (N-dodecil-n-n-dimetilamonio)-1-propanosulfonato, glucosa 5mM, glucosa oxidasa 1 μM, catalasa 1,9 mM, 40 °C. La velocidad de barrido fue 0,2 V/s. El ciclo negro se realizó bajo N_2 y el rojo después de 15 min bajo H_2 .

En el voltamperograma realizado bajo N_2 se observa algo de producción de H_2 , ya que hay un incremento de la corriente negativa a potenciales menores de -0.3 V. Pero al cambiar el gas en la celda a H_2 no se aprecia corriente catalítica directa de oxidación de H_2 , ya que no se produce ningún aumento de las corrientes de oxidación.

Cuando se añadió metil viológeno (MV), como mediador redox (Okura, I.y col., 1981), se midió corriente catalítica mediada, como se muestra en la Figura 4.4.5 (ciclo de color azul).

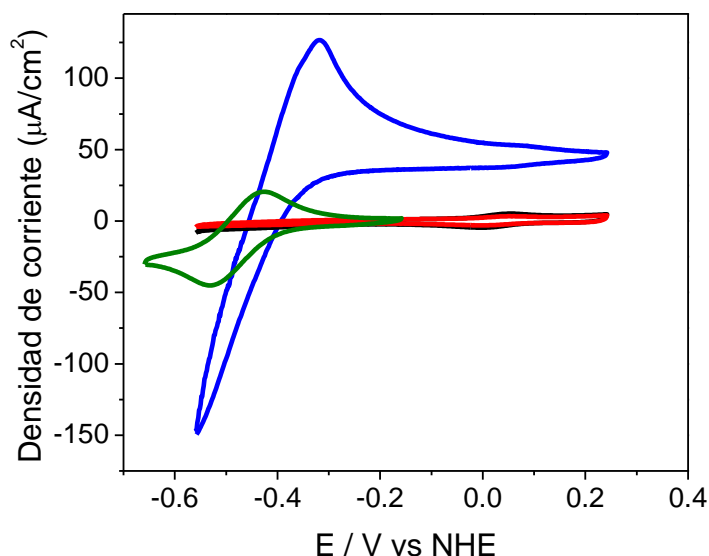


Figura 4.4.5. Voltamperograma cíclico de un electrodo HOPG-ArNH₂-Hasa *DvH*. Realizado a 0,2 V/s en tampón fosfato 0,1 M, pH 7, 0,2 % (N-dodecil-n-n-dimetilamonio)-1-propanosulfonato, glucosa 5mM, glucosa oxidasa 1 μM, catalasa 1,9 mM, 40 °C. Los ciclos de color negro y rojo corresponden a la Figura 4.4.4 y el ciclo azul se realizó a 0 rpm después de añadir MV 0,16 mM, bajo H₂. El ciclo de color verde corresponde a un electrodo sin Hasa y en presencia de MV 0,16 mM.

El ciclo de color verde (Figura 4.4.5) corresponde al control realizado con un electrodo HOPG-ArNH₂ sin modificar con Hasa *DvH* y en presencia de MV 0,16 mM, donde se aprecia la señal reversible del mediador con un potencial formal de -0,5 V. Al añadir MV 0,16 mM al electrodo modificado con Hasa *DvH*, se produce un aumento considerable de las corrientes de oxidación y reducción del mediador redox en comparación con el electrodo control sin Hasa *DvH*. Este efecto se debe al proceso catalítico de transferencia electrónica mediada (TM), que se esquematiza en la Figura 4.4.6. El MV es capaz de transportar los electrones entre la enzima y el electrodo, tanto para la oxidación como producción de H₂, independientemente de la orientación de las moléculas de enzima.

De estos resultados se concluye que hay Hasa *DvH* activa inmovilizada sobre el electrodo modificado, pero no presenta una correcta orientación hacia el electrodo que permita un proceso de TED con el electrodo.

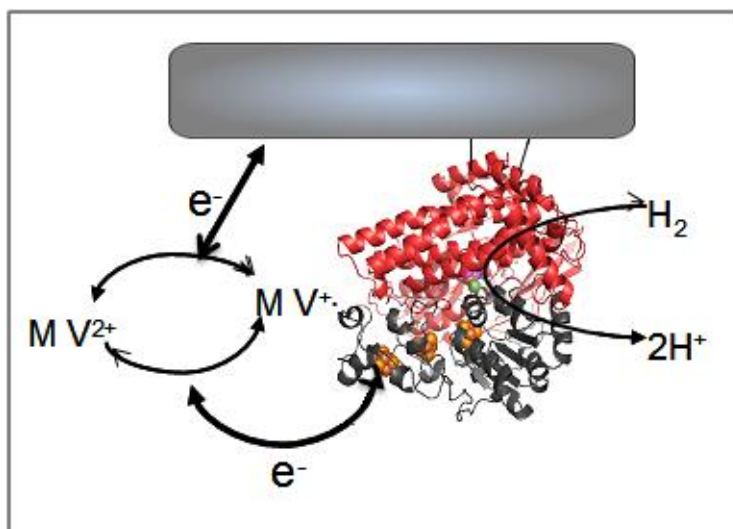


Figura 4.4.6. Representación de un electrodo HOPG modificado con Hasa orientada con el “cluster” distal al contrario que el electrodo, de tal manera que es necesario el uso de mediador para conseguir transferencia electrónica.

4.5. Inmovilización de Hasa *DvH* sobre electrodos de oro

También se estudió la inmovilización de la Hasa *DvH* sobre electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de tioles (SAM) siguiendo el método puesto a punto en el laboratorio anteriormente para *D. gigas* (Rüdiger, O.y col., 2010).

4.5.1. Pretratamiento

Un electrodo de oro de disco rotatorio ($A = 0,169 \text{ cm}^2$) se pulió con alúmina, se sonicó y se realizó la limpieza reductora y oxidativa, como se indica en el apartado 3.2.3.2.1 de Materiales y Métodos.

La voltamperometría cíclica que se muestra en la Figura 4.5.1 corresponde a una superficie de oro puro en H_2SO_4 0,5 M (Hoare, J. P., 1984). Presenta un pico pronunciado correspondiente a la reducción del óxido de oro a un potencial aproximado de 0,75 V vs Ag/Ag/Cl (Hoare, J. P., 1984).

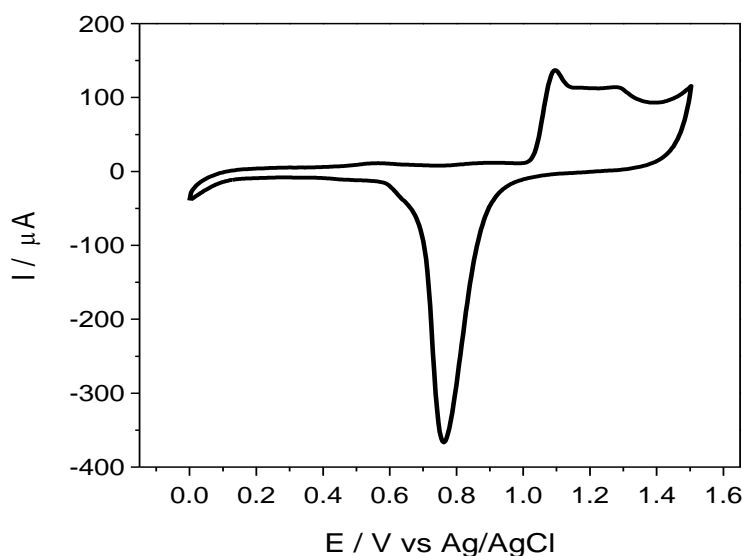


Figura 4.5.1. Voltamperograma cíclico de un electrodo rotatorio de oro realizado en H_2SO_4 0,5 M a 0,2 V/s.

El área microscópica real del electrodo de oro fue calculada usando la ecuación (1). La q_{real} es la carga correspondiente a la reducción del óxido de oro. Se calcula integrando la corriente del pico relacionado con la reducción del oro según la voltamperometría cíclica, (Figura 4.5.1), en H_2SO_4 0,5 M.

$$A_{\text{real}} = q_{\text{real}} / \sigma_t \quad (1)$$

La carga teórica (σ_t) asociada con la reducción de oro empleada fue $482 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ (Oesch, U. y col., 1983).

Conociendo el área real y el área geométrica del electrodo podemos calcular el factor de rugosidad, f , según la ecuación (2)

$$A_{\text{real}} = A_{\text{geométrica}} f \quad (2)$$

Para el cálculo de densidades de corriente catalíticas se consideró el área geométrica del electrodo. Como se emplearon varios tipos de electrodos de oro, para la inmovilización de la Hasa *DvH* y varían de un electrodo a otro, se detallan las diferentes áreas geométricas en la Tabla 4.5.1.

	Área geométrica (cm ²)
Rotatorio de oro	0,196
Placa de oro	3,140
Hilo de oro	0,157

Tabla 4.5.1. Áreas geométricas que presentan todas las clases de electrodos de oro empleados en este apartado.

4.5.2. Modificación química

Las superficies de oro limpias y caracterizadas se funcionalizaron con una monocapa autoensablada (SAM) de 4-aminotiofenol (4-ATP) sumergiéndolas en una disolución 1 mM de 4-ATP en etanol durante 18 hoas. Dicha monocapa dota a la superficie con una gran densidad de grupos amino orientados hacia la disolución. Estos grupos amino se utilizaron para tratar de orientar la Hasa *DvH* a través del “cluster” [4Fe4S] distal como se intentó sobre electrodos de carbono.

Las SAM de tioles sobre electrodos sufren una desorción reductiva a partir de un potencial aplicado suficientemente negativo debida a la reducción del azufre unido al oro, de forma que se rompe el enlace Au-S y se libera el tiol a la disolución (Walczak, M. M.y col., 1991). Para evitar la desorción de la monocapa, las medidas con enzima inmovilizada se realizaron a potenciales más positivos que -0,45 V vs NHE, ya que en esos intervalos de potencial la monocapa es mucho más estable.

El recubrimiento del tiol sobre el electrodo de oro puede ser calculado a partir de la desorción del tiol realizada en NaOH 0,5 M bajo N₂, como se representa en la Figura 4.5.2 para el electrodo de oro modificado con 4-ATP (Au-4-ATP).

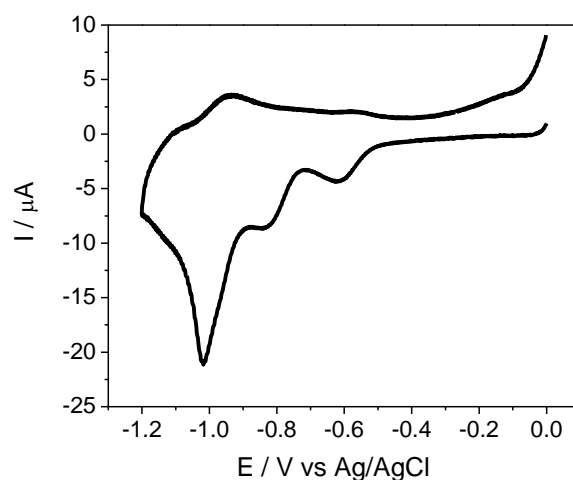


Figura 4.5.2. Desorción reductiva de SAM de 4-ATP en NaOH 0,5 M, bajo N₂ realizada a un electrodo rotatorio de Au-4-ATP 1 mM durante 18 horas a temperatura ambiente.

Se puede observar en la Figura 4.5.2, cómo al realizar la desorción de la monocapa, aparecen tres picos, a diferentes potenciales. Podrían corresponder con las tres maneras de adsorberse el 4-ATP sobre la superficie del oro: a través del azufre, del grupo amino o mediante el anillo aromático. La unión más fuerte es la de Au-S (Love, J. C. y col., 2005), por lo que las otras dos formas de unión, al estar menos favorecidas se desorben a potenciales de reducción menos negativos.

Integrando el pico intenso de reducción que aparece aproximadamente a 1 V, atribuido a la reducción del enlace Au-S y teniendo en cuenta que es un proceso monoelectrónico, podemos calcular el recubrimiento de la SAM de tiol para cada electrodo. Se obtuvo un recubrimiento promedio de 4-ATP de $(7,5 \pm 0,1) \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$, que corresponde a una monocapa compacta, ya que el recubrimiento teórico de una SAM de tiol es $7,47 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ (Love, J. C. y col., 2005).

4.5.3. Inmovilización de hidrogenasa

4.5.3.1. Inmovilización covalente de Hasa D. V. Hildenborough a Au-4-ATP

Una vez modificado el electrodo con la SAM de 4-ATP se depositó la enzima sobre el electrodo para favorecer una correcta orientación de Hasa DvH mediante interacciones electroestáticas durante 20 minutos. Posteriormente se

procedió a la formación de enlaces amida entre los grupos amino de la monocapa y los ácidos carboxílicos de la Hasa *DvH* mediante la activación con NHS y ECD, dando lugar a un electrodo Au-4-ATP-Hasa. En la Figura 4.5.3 se observa la respuesta del electrodo en diferentes atmósferas. Como respuesta de referencia se tomó la obtenida al inhibir la hidrogenasa con CO (Figura 4.5.3 gris). El electrodo Au-4-ATP-Hasa medido bajo atmósfera de N_2 ofreció una corriente electroenzimática de producción de H_2 a potenciales más negativos que -0,35 V vs. NHE (Figura 4.5.3, VC negro). Al saturar la atmósfera con H_2 la respuesta del electrodo Au-4-ATP-Hasa fue una corriente de oxidación de H_2 mayor que la obtenida en los voltamperogramas realizados bajo atmósfera de N_2 o en presencia de CO. Al aumentar la velocidad de rotación del electrodo de 0 rpm hasta 2500 rpm (Figura 4.5.3 verde) se produce un aumento de corriente catalítica de oxidación de H_2 debido al aumento de la velocidad de transporte del sustrato hacia la superficie del electrodo. Esto indica que a 0 rpm la transferencia de masa del sustrato es la etapa limitante del proceso catalítico, es decir, la Hasa *DvH* consume el H_2 a una velocidad mayor que la difusión del H_2 a la superficie del electrodo. La rotación del electrodo a 2500 rpm aumenta el transporte de H_2 al electrodo hasta el punto en que la etapa limitante en ese régimen es la transferencia electrónica entre el enzima y el electrodo. Este efecto se pone de manifiesto al no alcanzarse un plató a los potenciales más positivos (Léger, C.y col., 2008).

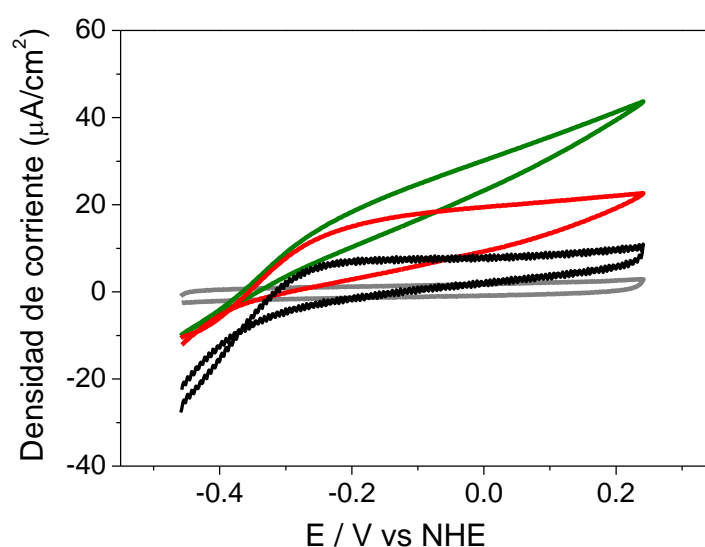


Figura 4.5.3. Voltamperometría cíclicas de un electrodo rotatorio de Au-4-ATP-Hasa *DvH* bajo N_2 a 0 rpm (negro), bajo H_2 a 0 rpm (rojo), y bajo H_2 a 2500 rpm (verde) y bajo CO (color gris).

La velocidad de barrido fue 20 mV/s. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 0,1 M, pH 6, en presencia de 0,2 % (N-dodecil-n-n-dimetilamonio)-1-propanosulfonato, glucosa 5mM, glucosa oxidasa 1 μ M, catalasa 1,9 mM y a 40 °C.

Los resultados de voltamperometría indican que se ha conseguido medir TED entre la Hasa *DvH* y el electrodo de oro modificado. Pero los valores de densidad de corriente catalítica de oxidación de H₂ medidos son mucho menores que los obtenidos con la Hasa soluble *D. gigas* inmovilizada por el mismo método (Rüdiger, O.y col., 2010). Esto ocurre a pesar de que la Hasa *DvH* presenta una actividad catalítica mucho mayor en disolución, sobre todo para la producción de H₂ (Valente, F.y col., 2005).

Una posible explicación sería que durante la inmovilización sobre el Au-4-ATP, la Hasa *DvH* hubiera perdido su cadena hidrofóbica, la cual le otorga su alta actividad catalítica. Esta cadena puede romperse por hidrólisis cuando no está protegida por un detergente, obteniéndose la forma soluble y menos activa de la Hasa *DvH* (Valente, F.y col., 2005). Al realizar la unión covalente sobre el electrodo es probable que se pierda esta protección de la cadena hidrofóbica por parte del detergente. Por lo tanto, la elección del detergente en el proceso de purificación y durante el proceso de inmovilización sobre el electrodo es crucial. Se comprobó que la presencia de un detergente no iónico mejora la actividad de la enzima respecto al detergente zwitteriónico, ya que este último es más desnaturizante. Por lo que en los siguientes experimentos, la Hasa *DvH* se estabilizó en presencia del detergente DDM.

El centro activo de las Hasas inmovilizadas sobre electrodos se puede oxidar al aplicar potenciales positivos en condiciones anaerobias, dando lugar a un estado inactivo de la Hasa. Esta inactivación es reversible si se aplica un potencial suficientemente negativo, reduciéndose rápidamente y generando de nuevo la forma activa de la Hasa (Jones, A. K.y col., 2003). En la Figura 4.5.4, se muestran los voltamperogramas que ofrece un electrodo Au-4-ATP-Hasa *DvH* para diferentes velocidades de barrido. El voltamperograma realizado a 50 mV/s (color gris) indica que el barrido a potenciales más oxidativos provoque una disminución de la corriente por inactivación anaerobia de la Hasa

inmovilizada. No obstante, la reducción de la velocidad de barrido sí puso de manifiesto la inactivación anaerobia (Figura 4.5.4).

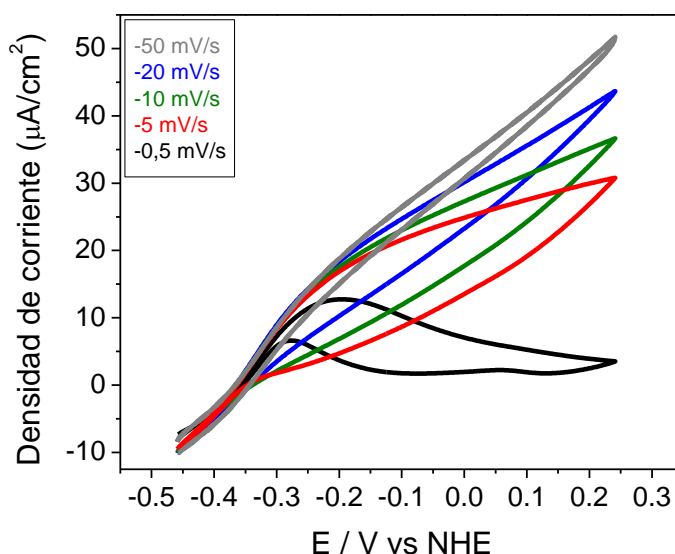


Figura 4.5.4. Efecto que produce la variación de la velocidad de barrido en el voltamperograma cíclico de un electrodo rotatorio de Au-4-ATP-Hasa DvH. Las medidas se realizaron bajo 1 atm de H_2 en tampón fosfato 0,1 M, pH 6, en presencia de 0,2 % (N-dodecil-n-n-dimetilamonio)-1-propanosulfonato, glucosa 5mM, glucosa oxidasa 1 μ M, catalasa 1,9 mM, y a 40 °C, a 2500 rpm.

Se aprecia cómo al disminuir la velocidad de barrido disminuye también la corriente catalítica al ir hacia los potenciales positivos, debido a que la Hasa DvH tiene más tiempo para inactivarse. Cuando la velocidad de barrido es más lenta, se aprecia que en el barrido de vuelta hacia potenciales negativos se produce un aumento de la corriente catalítica, que es debido a la reactivación de la enzima al reducirse por el electrodo. El valor del potencial redox correspondiente al punto de inflexión al cual se produce el proceso de reactivación en el tramo de la dirección reductiva se denomina E_{switch} (Jones, A. K. y col., 2003). Según estos autores, el mínimo que se obtiene al derivar la intensidad de corriente corresponde al valor de potencial redox al que tiene lugar la transformación de la forma inactiva y activa de la hidrogenasa.

Se observa en la Figura 4.5.5 que existen dos mínimos en la derivada, determinándose los valores de E_{switch} -0,239 V vs NHE y 0,092 V vs NHE. La

existencia de dos E_{switch} podría correlacionarse con las reactivaciones de las dos formas oxidadas de la Hasa *DvH*, Ni-IS y Ni-OX.

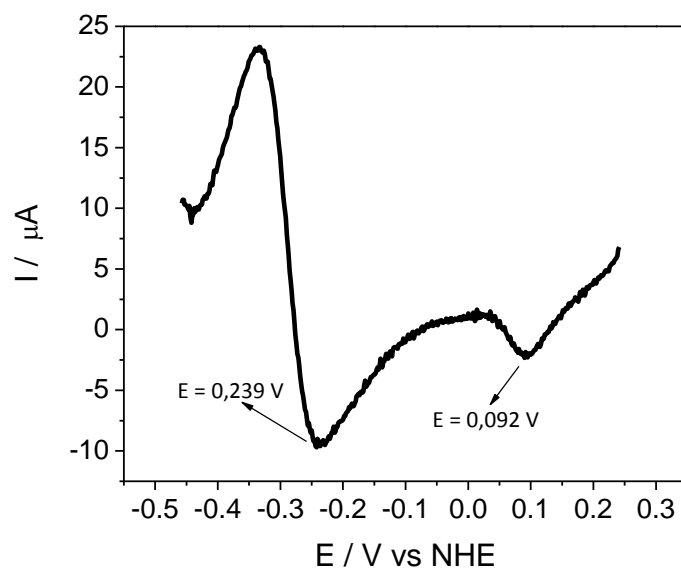


Figura 4.5.5. Derivada del ciclo de vuelta (dirección reductiva) de la voltamperometría realizada a 0,5 mV/s (ciclo de color negro) en la Figura 4.5.4.

También, se estudió el efecto del O_2 en la actividad electrocatalítica del electrodo Au-4-ATP-Hasa. Para ello se realizó la cronoamperometría que se muestra en la Figura 4.5.6.

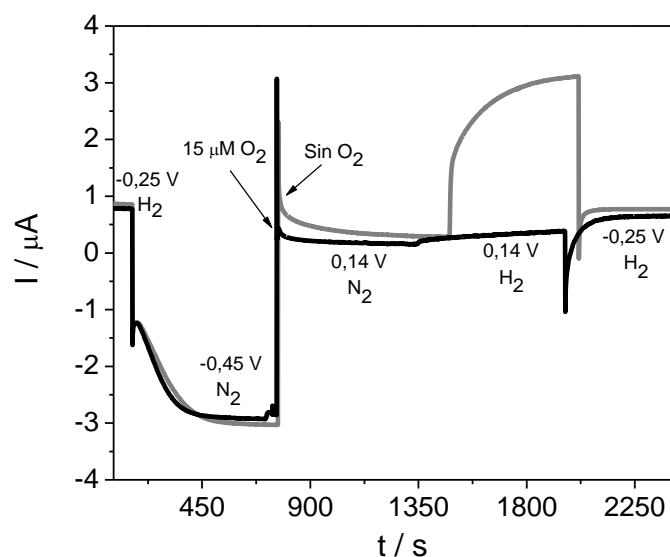


Figura 4.5.6. Cronoamperometría realizada a un electrodo de Au-4-ATP-Hasa *DvH* a 40 °C y 2500 rpm. La línea de color negro corresponde al experimento al cual se añadió 15 μM de O_2 y la línea de color gris al realizado en ausencia de O_2 .

El estado redox del centro activo de la enzima inmovilizada se pudo controlar mediante el potencial aplicado en el electrodo. En primer lugar se trabajó a -0,25 V bajo 1 atm de H₂ para medir corrientes catalíticas de oxidación de H₂ y a continuación se cambió el gas de la celda a N₂ y el potencial aplicado a -0,45 V. Se observa un cambio en la corriente apareciendo corrientes negativas, debido a que la Hasa DvH está catalizando la reacción inversa, es decir reduciendo los protones para producir H₂. Cuando el potencial aplicado es de 0,14 V, no es capaz la Hasa DvH de reducir los protones y se pierde la corriente catalítica de reducción. Otro comportamiento se obtiene al añadir O₂ 15 µM en la disolución de la celda de medida: a diferencia del experimento realizado en ausencia de O₂, la corriente electroenzimática de oxidación se inhibe totalmente bajo H₂.

Este resultado confirma que la actividad de oxidación de H₂ de la Hasa DvH sobre el electrodo se inhibe completamente en presencia de O₂, generándose las formas inactivas del centro activo de la Hasa DvH (Ni-IS y Ni-OX), como se observó también para la actividad de intercambio isotópico (apartado 4.3).

4.5.3.2. Inserción de Hasa DvH en una bicapa fosfolipídica soportada sobre oro

Como la Hasa DvH está asociada *in vivo* con la membrana citoplasmática del organismo a través de su cadena N-terminal de la subunidad grande y su actividad depende de la presencia de detergente o de fosfolípidos (Valente, F.y col., 2005). Se puede concluir que la presencia de la cadena hidrofóbica tiene un importante papel estructural en la enzima y está implicada en sus interesantes propiedades catalíticas.

Para inmovilizar la Hasa DvH en sus condiciones catalíticas óptimas se ha de mantener su cadena hidrofóbica intacta. Una primera aproximación fue simular su entorno *in vivo* generando una membrana biomimética sobre el electrodo y comprobar si podía insertarse la enzima en ella a través de su cadena hidrofóbica.

Todos los experimentos de este apartado se realizaron usando como electrodo de trabajo una placa de Au (111), material que permite realizar tanto imágenes de AFM como medidas electroquímicas. De este modo se pudieron correlacionar las propiedades electrocatalíticas del electrodo enzimático con su morfología.

Se modificó dicha placa de oro con SAM de 4-ATP y se incubó en una disolución tamponada a pH 5, un pH menor que el pK_a de la amina situada en la monocapa, para que la superficie Au-4-ATP se encontrara protonada. Este cambio en el valor de pH facilita la formación de bicapas de lípidos sobre el oro, ya que éstas no se forman espontáneamente (Wang, X.y col., 2010). Dado que se utilizaron fosfolípidos de *E. coli* cargados negativamente, se esperaba que la superficie de oro cargada positivamente favoreciera la formación de una bicapa de fosfolípidos sobre ella.

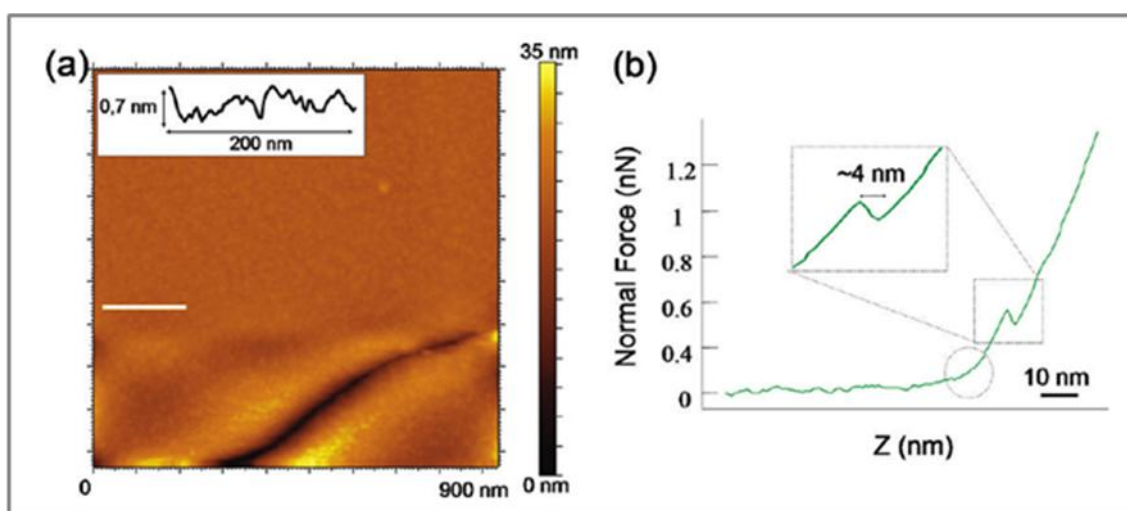


Figura 4.5.7. (a) Imagen topográfica de AFM realizada en una placa de Au-4-ATP-fosfolípidos. El inserto corresponde al perfil topográfico de la línea blanca trazada en la imagen. **(b)** Se representa la fuerza frente a la distancia (eje z) de la superficie de oro. El círculo indica la parte de la curva que corresponde al contacto entre la punta del AFM y la superficie. El cuadrado indica la parte de la curva asociada con la ruptura de la bicapa.

Se realizó la caracterización por AFM de las placas Au-4-ATP incubadas con fosfolípidos para confirmar la formación de una bicapa soportada que simulase la membrana celular. Se observa en el perfil topográfico (Figura 5.4.7a) variaciones de altura en la muestra de 1 nm. Se estudió el espesor de la superficie depositada sobre el 4-ATP mediante una curva de fuerza-distancia

(F-Z) (Figura 5.4.7b). La primera parte de la curva corresponde al momento en que la punta del AFM y la superficie no están interaccionando. A medida que la punta se va acercando se genera una interacción repulsiva entre la punta y el material inmovilizado (se indica con un círculo). A partir de este punto, según se acerca la punta del AFM a la superficie, la fuerza normal va aumentando de manera lineal hasta provocar la ruptura del recubrimiento del sustrato, fenómeno caracterizado por la discontinuidad que exhibe la pendiente. Este cambio de la pendiente refleja el cambio en las propiedades mecánicas del material bajo la punta del AFM. La fuerza que tiene lugar cuando se produce la ruptura (0,5 nN, 4nm de penetración) es comparable con el comportamiento descrito para una punta que penetra y rompe una bicapa de lípidos de 4 nm de grosor depositados sobre una superficie (Garcia-Manyes, S.y col., 2006) (Quist, A. P.y col., 2007).

La superficie de oro modificada con la bicapa de fosfolípidos descrita anteriormente, se incubó en presencia de una disolución de Hasa *DvH* con detergente y en presencia de CALBIOSORB (BIOBEADS®), que son esferas milimétricas capaces de absorber el detergente de la muestra pero sin afectar a los fosfolípidos. El uso de este producto fue crucial para permitir la eliminación del detergente DDM durante el proceso de inserción de la Hasa *DvH* y evitar que disolviera la bicapa lipídica depositada sobre el oro.

Para caracterizar la superficie después de incubar con la Hasa *DvH* se realizaron imágenes de AFM (Figura 4.5.8).

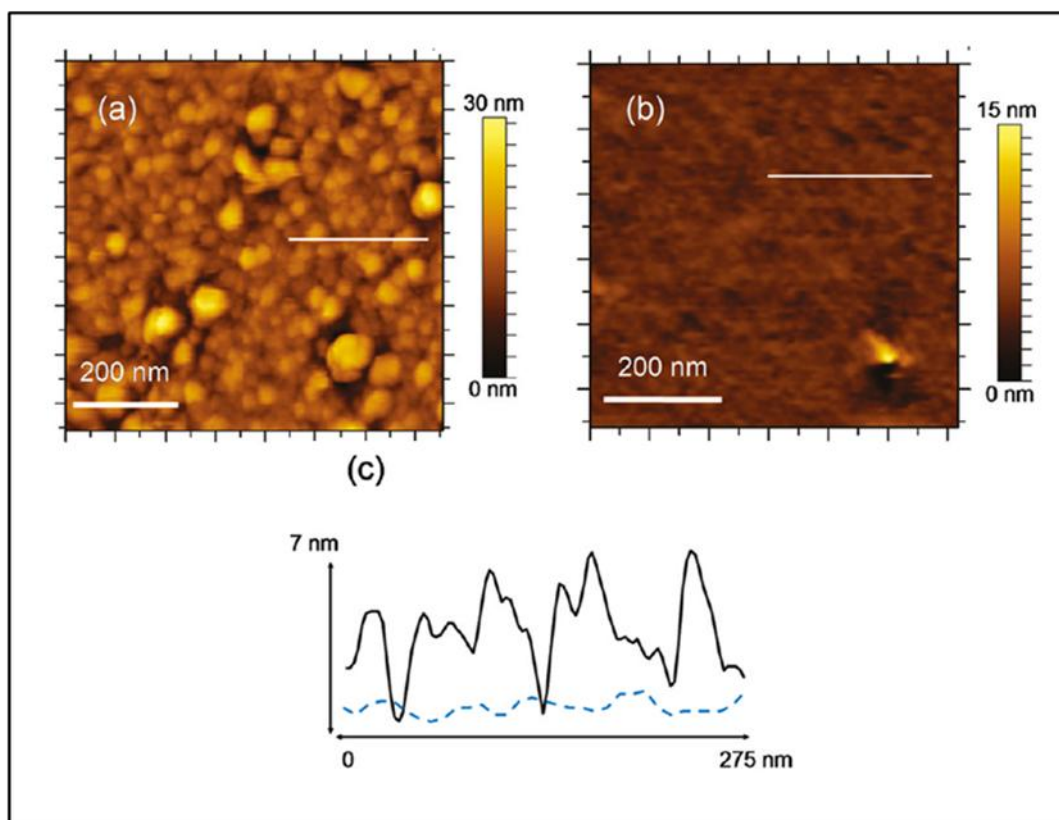


Figura 4.5.8. Imágenes de AFM realizadas en una placa de Au-4-ATP-fosfolípidos-Hasa *DvH* en presencia de CALBIOSORB. (a) Hasa *DvH*, conformación de membrana. (b) Hasa *DvH*, conformación soluble. (c) Perfiles topográficos correspondientes a las líneas trazadas en la imagen a (color negro) y de en la imagen b (azul).

Se puede apreciar en la Figura 4.5.8a, cómo la superficie presenta un aspecto globular debida a las moléculas de Hasa *DvH* inmovilizadas, con una altura media próxima a 5 nm (Figura 4.5.8c), la cual corresponde a la dimensión longitudinal de la molécula de Hasa *DvH* determinada por difracción de rayos X (Marques, M. C.y *col.*, 2010) y con los resultados de otros estudios de AFM y STM de hidrogenasas (Hoeben, F. J. M.y *col.*, 2008) (Nakamura, C.y *col.*, 1998). Por lo tanto, los resultados de AFM sugieren que las moléculas de Hasa se han insertado en la bicapa de fosfolípidos soportada sobre el Au a través de sus colas hidrofóbicas, tal como se muestra en el esquema de la Figura 4.5.9.

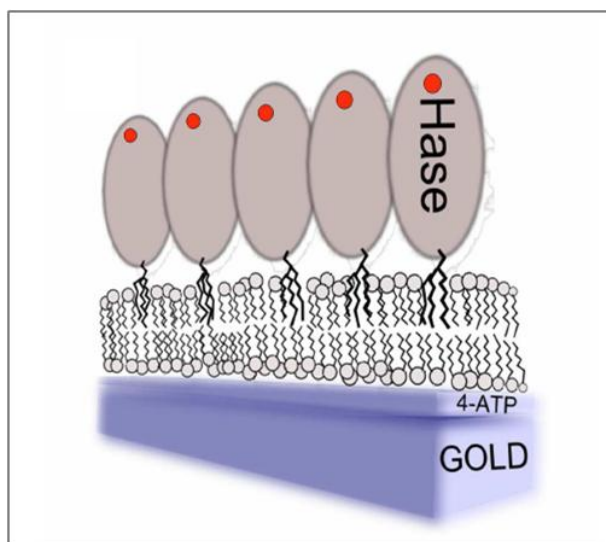


Figura 4.5.9. Representación esquemática de moléculas de Hasa *DvH* insertadas en una bicapa de fosfolípidos a través de su cadena hidrofóbica. Los círculos rojos representan los “clusters” [4Fe4S] distales de las moléculas de Hasa *DvH*.

Para confirmar que las moléculas de Hasa *DvH* se inmovilizan por inserción de sus cadenas hidrofóbicas en la bicapa fosfolipídica y medir su actividad catalítica se realizaron medidas electroquímicas. En la Figura 4.5.10, se puede observar que no se aprecia ninguna diferencia entre los voltamperogramas medidos bajo atmósfera de N_2 (color negro) y bajo H_2 (color rojo), por lo que no se detecta oxidación electrocatalítica de H_2 por TED entre la enzima y el electrodo. Este resultado es coherente con una hipotética inserción de la Hasa *DvH* en la bicapa lipídica se produjo a través de su cadena hidrofóbica, ya que en este caso el “cluster” [4Fe4S] distal (representado en rojo en el Figura 4.5.9) quedaría situado en el extremo contrario de la Hasa *DvH* (Marques, M. C.y col., 2010). Por lo tanto, en esa orientación la molécula de Hasa *DvH* se encontraría demasiado lejos de la superficie del electrodo para establecer TED eficaz.

La adición de mediador redox MV, sí que midió electrocatálisis de oxidación de H_2 (Figura 4.5.10). Se puede observar cómo el proceso se encuentra limitado por la transferencia de masa del H_2 al electrodo, ya que el electrodo se encuentra en estado estacionario. La corriente catalítica alcanza un máximo al potencial de +50 mV, y posteriormente va disminuyendo debido a que el H_2 se consume a una velocidad mayor a la que llega al centro activo de la enzima. Al tratarse de una placa de oro no se pudo adaptar al rotor, con lo

que no se pudieron realizar medidas a diferentes velocidades de rotación. Además, no se barrieron potenciales menores de -350 mV, para evitar la desorción reductiva de SAM de 4-ATP, por lo que no se aprecia producción de H_2 en la medida realizada bajo N_2 . Al añadir 44 μM CO se observa cómo el proceso catalítico desaparece casi completamente (color gris). Esto ocurre porque el CO se coordina al Ni en el centro activo de la Hasa *DvH*, como se observó por FTIR en el apartado 4.2, inhibiendo la actividad catalítica de la Hasa *DvH*, como se muestra en la Figura 4.3.1.

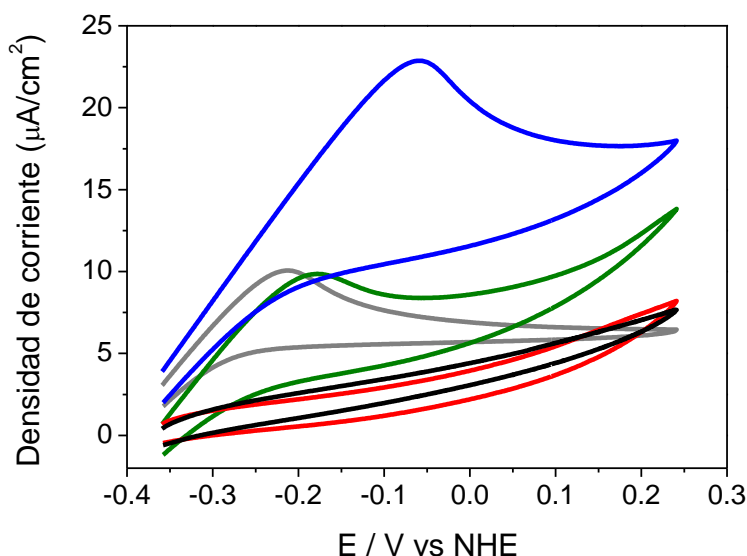


Figura 4.5.10. Voltamperometrías cíclicas realizadas en placa de Au-4-ATP-fosfolípidos-Hasa *DvH*. El ciclo negro corresponde a la medida realizada bajo 1 atm de N_2 y el ciclo rojo a la realizada bajo 1 atm de H_2 . Los ciclos verde y azul corresponden a las medidas realizadas en presencia de MV 0,16 mM bajo N_2 e H_2 respectivamente. El ciclo gris se realizó en presencia de 44 μM de CO. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 0,1 M a pH 6, 40 °C y velocidad de barrido de 20 mV/s.

Para confirmar que la inmovilización de la Hasa *DvH* fue a través de la inserción de su cadena hidrofóbica en la bicapa de fosfolípidos, se realizó un experimento control con Hasa *DvH* en su conformación soluble, es decir sin su cadena hidrofóbica. La imagen de AFM (Figura 4.5.8b) muestra cómo la superficie presenta fundamentalmente el aspecto de la bicapa lipídica soportada sobre el oro, con la presencia de solo unos pocos agregados de

Hasa *DvH*. La rugosidad del electrodo en este caso (Figura 4.5.8c) es muy similar a la de una bicapa lipídica depositada sobre oro (Figura 4.5.7a).

Al realizar las medidas electroquímicas con este electrodo (Figura 4.5.11) se observa que no se produce oxidación de H_2 por transferencia electrónica directa (color rojo) y cómo en presencia de mediador, MV, apenas se mide transferencia electrónica mediada (color azul). La ausencia de procesos bioelectrocatalíticos junto con la imagen obtenida por AFM coinciden en que la ausencia de la cadena hidrofóbica conduce a una inmovilización muy pobre de Hasa *DvH* sobre la bicapa lipídica.

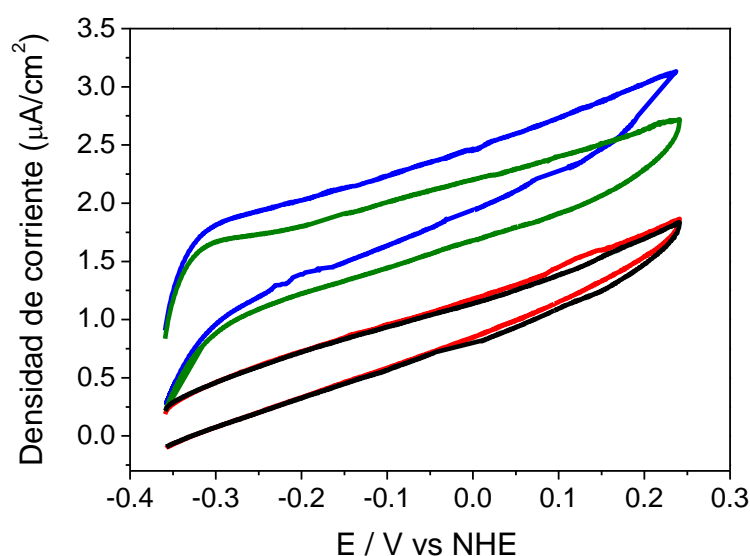


Figura 4.5.11. Voltamperometrías cíclicas realizadas con la placa de Au-4-ATP-fosfolípidos-Hasa *DvH* (forma soluble). El ciclo negro corresponde a la medida realizada bajo 1 atm de N_2 y el ciclo rojo bajo 1 atm de H_2 . Los ciclos verde y azul corresponden a las medidas realizadas en presencia de MV 0,16 mM bajo N_2 e H_2 respectivamente. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 0,1 M pH 6, a 40 °C y velocidad de barrido 20 mV/s.

De todos estos resultados se puede concluir, que la estrategia desarrollada permite inmovilizar la Hasa *DvH* catalíticamente activa sobre una bicapa de fosfolípidos a través de la cadena hidrofóbica, tal como se muestra en la Figura 4.5.9. Sin embargo, la orientación con la que quedan las moléculas de Hasa *DvH* inmovilizadas no es la adecuada para establecer transferencia electrónica directa, requiriéndose un mediador redox para medir electrocatálisis.

4.5.3.3. Co-Inmovilización de Hasa D. V. Hildenborough y fosfolípidos

Con el fin de inmovilizar la Hasa DvH en su conformación más activa, pero con una orientación adecuada para obtener TED, se desarrolló una estrategia diferente basada en la co-inmovilización de la Hasa DvH y fosfolípidos en una sola etapa. Para ello se incubó la superficie del electrodo Au-4-ATP, cargada positivamente, en una disolución que incluía Hasa DvH, fosfolípidos y CALBIOSORB. Fue necesaria la presencia de CALBIOSORB durante el proceso de inmovilización para sustituir *in situ* el detergente DDM, que mantiene la enzima en su forma más activa, por los fosfolípidos.

De esa manera se esperaba, que la enzima pudiera orientarse mediante interacciones electrostáticas sobre la superficie del electrodo en función de su momento dipolar (Rüdiger, O.y col., 2010). Al mismo tiempo, la presencia de fosfolípidos estabilizara de las cadenas hidrofóbicas de la Hasa DvH. El pH al que se lleva a cabo la reacción provoca que la región cercana al “cluster” [4Fe4S] distal de la Hasa DvH se encuentre cargada negativamente, favoreciendo la orientación hacia la superficie del electrodo mientras que las cadenas lipídicas quedarían expuestas hacia la disolución. Posteriormente, se añadió NHS/EDC con el fin de unir covalentemente la Hasa DvH al electrodo por enlaces amida. En la Figura 4.5.12, se detalla esquemáticamente la estructura objetivo de esta estrategia de co-inmovilización.

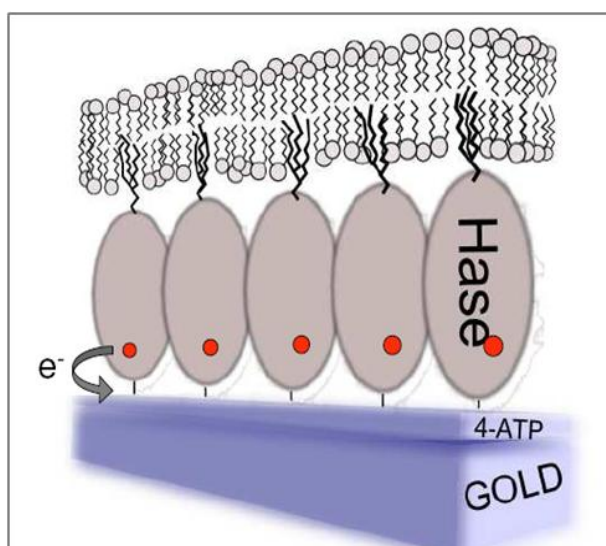


Figura 4.5.12. Representación esquemática de moléculas de Hasa DvH inmovilizadas covalentemente y orientada sobre una superficie de oro modificada con 4-ATP y con sus cadenas hidrofóbicas estabilizadas por una bicapa de fosfolípidos.

Para caracterizar la morfología del sistema Au-4-ATP-hasa-fosfolípidos se realizaron estudios de AFM como muestra la Figura 4.5.13.

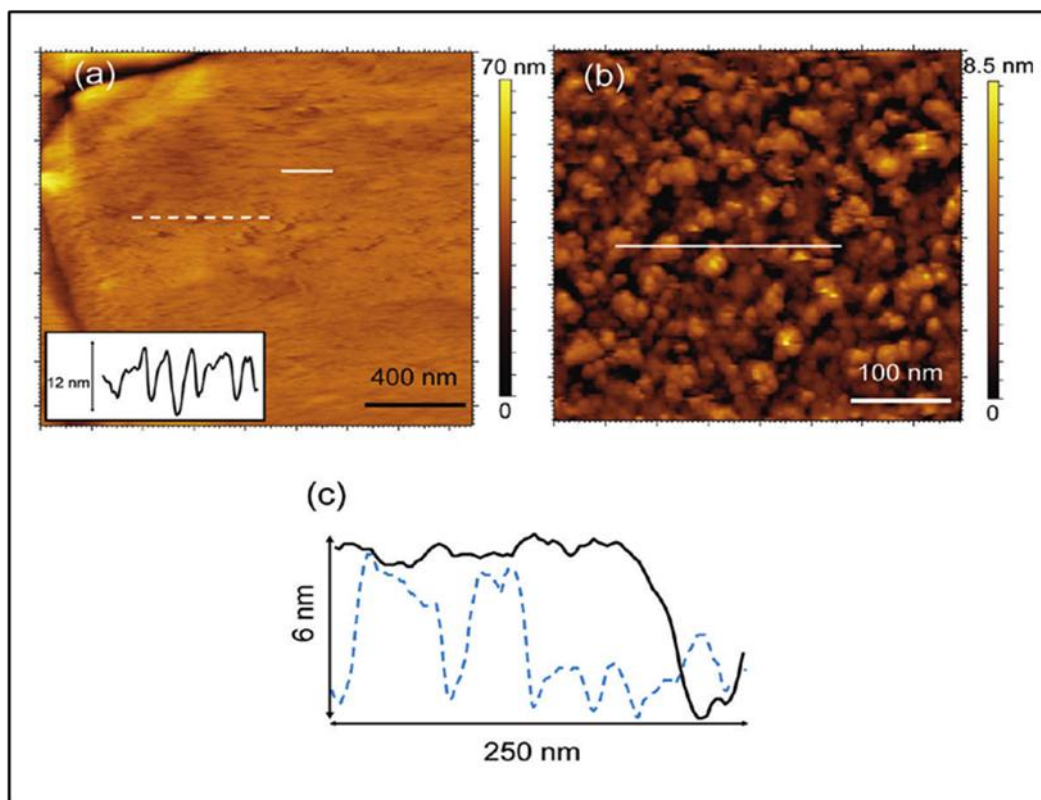


Figura 4.5.13. Se representa en la figura (a) la imagen topográfica de AFM realizada a una placa de Au-4-ATP-Hasa DvH-fosfolípidos. La imagen insertada corresponde al perfil del eje z asociado a la línea blanca punteada. La figura (b) representa la figura (a) después de haber tratado la muestra durante dos minutos con Triton X-100 1 μ M. La figura (c) representa el perfil del eje z correspondiente a las líneas blancas sólidas de la figura a (color negro) y figura b (color azul).

En la imagen topográfica realizada por AFM no se observa rastro de Hasa DvH, siendo en general la superficie muy plana con la excepción de algunos agujeros (Figura 4.5.13a). Sin considerar los agujeros, la rugosidad de la muestra es de $(0,7 \pm 0,4)$ nm, como indica la línea negra de la Figura 4.5.13c, la cual es muy similar a la medida para la bicapa fosfolipídica soportada directamente sobre Au-4-ATP (Figura 4.5.7a). Se encontraron algunos agujeros en la muestra con una altura de 12 nm y otros de menor altura, 6 nm, como el que se representa en la Figura 4.5.13c. Los agujeros mayores corresponden a la altura de la arquitectura molecular propuesta en el esquema de la Figura 4.5.12, mientras que los menores se podrían asignar a

regiones incompletas debido a la pérdida de la monocapa de enzima o a la bicapa de fosfolípidos. Para comprobar esta hipótesis se trató la muestra con Triton X-100, un tensioactivo utilizado para solubilizar bicapas lipídicas, y se volvió a analizar la muestra por AFM. Los resultados se muestran en las Figuras 4.5.13b y 4.5.13c (línea azul), donde se aprecia una estructura globular, que corresponde a moléculas de Hasa *DvH* inmovilizadas sobre la superficie. También se observan fragmentos de 5 a 6 nm que corresponderían a restos de la bicapa de fosfolípidos. El estudio de AFM corrobora la arquitectura molecular representada en la Figura 4.5.12, con la Hasa *DvH* unida covalentemente a Au-4-ATP y la bicapa de fosfolípidos formada sobre la monocapa de Hasa *DvH*.

Se realizaron medidas electroquímicas para evaluar la actividad catalítica del electrodo modificado y la orientación de la Hasa inmovilizada. La Figura 4.5.14 muestra los resultados de una placa Au-4-ATP-Hasa *DvH*-fosfolípidos funcionalizada como electrodo de trabajo en una celda electroquímica.

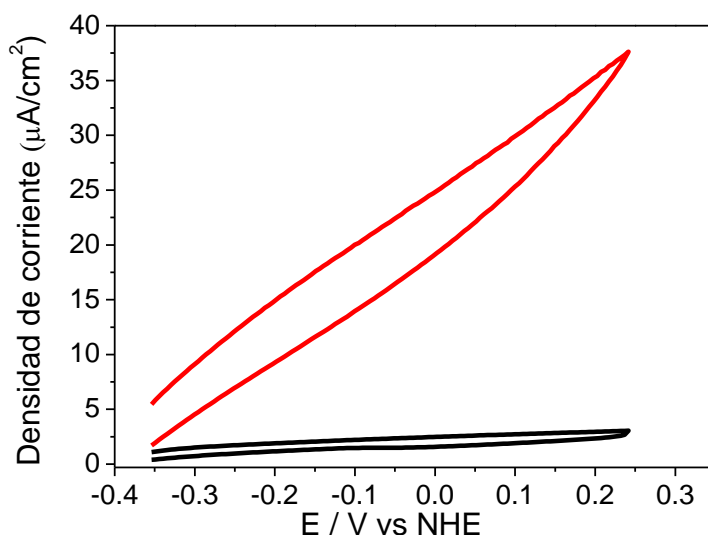


Figura 4.5.14. Voltamperogramas cíclicos de una placa de Au-4-ATP-Hasa *DvH*-fosfolípidos. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 0,1 M a pH 6, 40 °C a 20 mV/s, bajo N₂ (ciclo color negro) y bajo H₂ (ciclo de color rojo).

Se realizaron medidas bajo N₂ (ciclo de color negro) y bajo H₂ (ciclo de color rojo). Se observa cómo aumenta considerablemente la corriente de

oxidación en presencia de H_2 , es decir la Hasa *DvH* inmovilizada sobre el electrodo cataliza la oxidación de H_2 mediante TED. La topografía obtenida por AFM junto con los resultados electroquímicos permiten concluir que se consiguió inmovilizar las moléculas de Hasa *DvH* con el “cluster” distal hacia la superficie del electrodo, como se representó en la Figura 4.5.12.

Debido a la alta resistencia eléctrica que presentan estas placas de oro al ser empleadas como electrodos, se extendió el análisis electroquímico con electrodos de hilo de oro, cuya geometría además resulta más apropiada para la difusión de H_2 hacia el electrodo. Se observa en la Figura 4.5.15 que estos electrodos presentan menor corriente capacitiva que las placas de oro. La medida realizada bajo atmósfera de N_2 muestra una señal redox reversible, con el pico catódico a 100 mV y el anódico a -150 mV. Este par redox pudiera corresponder a uno de los “cluster” $[4Fe4S]$ de la enzima inmovilizada, a pesar de aparecer a potenciales más altos de lo esperado. No se aprecia producción de H_2 en la medida realizada bajo N_2 debido a que no se barrieron potenciales menores de -350 mV, para evitar la desorción reductiva de la monocapa creada por SAM de 4-ATP en oro. En el voltamperograma realizado bajo H_2 se inicia el proceso de oxidación de H_2 a -350 mV y se alcanza un pseudo plató a ± 50 mV.

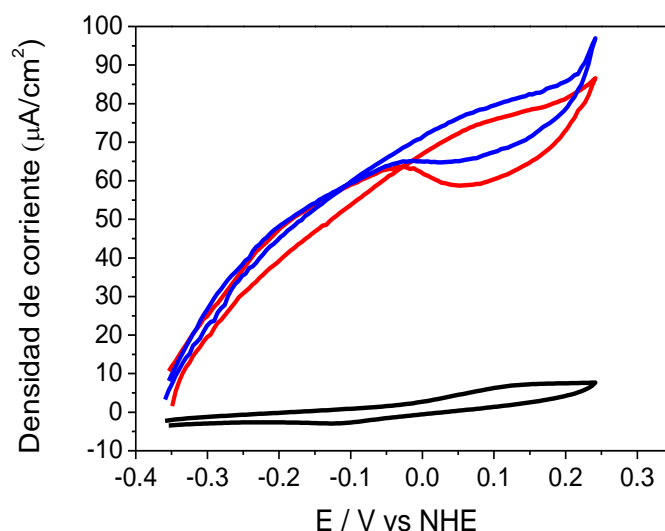


Figura 4.5.15. Respuesta electroquímica de un hilo de Au-4-ATP-Hasa *DvH*-fosfolípidos inmovilizada covalentemente. Las medidas se realizaron en tampón fosfato 0,1 M a pH 6, 40 °C a 20 mV/s, bajo N_2 (ciclo color negro) y bajo H_2 (ciclo de color rojo). El ciclo de color azul corresponde a la medida realizada bajo H_2 y en presencia de MV 0,16 mM.

La densidad de corriente obtenida medida al potencial de +50 mV fue 80 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. La corriente catalítica en presencia de mediador redox, MV, apenas aumentó, indicando que la inmensa mayoría de moléculas de Hasa DvH presentan TED con el electrodo. Por lo tanto la orientación que presentan las moléculas de Hasa DvH sobre el electrodo es la adecuada, es decir con los “clusters” $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ distales encarados hacia el oro (Figura 4.5.12).

En el voltamperograma realizado bajo H_2 (ciclo de color rojo) la corriente catalítica aumenta al barrer hacia mayores potenciales, pero en el ciclo de vuelta se observa que al barrer desde 250 a 0 mV hay una disminución en la corriente catalítica, mientras que a potenciales menores de 0 mV la corriente de oxidación aumenta de nuevo. Este comportamiento es debido a la inactivación anaeróbica de la Hasa DvH a altos potenciales y la posterior reactivación a medida que el potencial disminuye, de manera análoga a como ya se estudió en el apartado 4.5.3.1. (Jones, A. K. y col., 2002).

No se pudieron realizar medidas a diferentes velocidades de rotación para estudiar la dependencia del proceso catalítico de la velocidad de transporte de sustrato hacia el electrodo modificado debido a la configuración que presenta el hilo de oro sobre el soporte.

El valor de E_{switch} calculado a partir del voltamperograma realizado en presencia de H_2 (Figura 4.5.16) resultó ser 0,007 V vs NHE, un valor mucho menor que el E_{switch} calculado en ausencia de fosfolípidos, -0,239 V vs NHE, pero muy próximo al segundo valor calculado, 0,092 V vs NHE (Figura 4.5.5). Las diferencias entre los valores obtenidos en la conformación anterior y la presente, permiten asignar el valor de -0,239 V al estado inactivo Ni-IS del centro activo y el valor próximo a 0 V con el estado Ni-OX; ya que la presencia de fosfolípidos simula la situación *in vivo* de la Hasa DvH y el estado Ni-IS se obtiene al purificar la Hasa DvH. Por lo tanto, al oxidarse la Hasa DvH sobre el electrodo estando en su conformación de proteína de membrana se favorece la formación del mismo estado inactivo que se obtiene al aislar la Hasa de su entorno *in vivo*. Otra posible explicación a esta diferencia de E_{switch} es que cuando se inmoviliza en ausencia de fosfolípidos la Hasa DvH podría perder la cadena hidrofóbica y transformar su conformación a la forma soluble (Marques, M. C. y col., 2010). Siguiendo este razonamiento se podría asignar el valor de E_{switch} de -0,239 V a la forma soluble y el que se encuentra próximo a 0 V al

E_{switch} de la forma de membrana. Al inmovilizar covalentemente la Hasa *DvH* sobre Au-4-ATP en ausencia de fosolípidos se podría formar una mezcla de ambas conformaciones donde predomina la forma soluble, reflejándose en la obtención de dos valores de E_{switch} . Sin embargo, hay que tener en cuenta que el valor del E_{switch} depende también de parámetros cinéticos no relacionados con la catálisis enzimática, por lo que no se puede descartar que la diferencia entre los valores de E_{switch} que presentan ambos tipos de electrodos dependiese de otros factores como la geometría y rugosidad del electrodo, la ausencia o presencia de fosolípidos ó el régimen de transferencia de masa en la VC realizada.

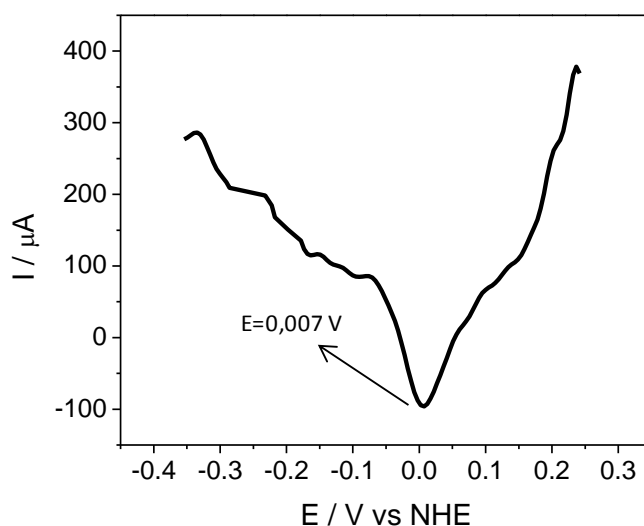


Figura 4.5.16. Derivada del ciclo de vuelta (dirección reductiva) de la voltamperometría realizada a 20 mV/s (ciclo de color rojo) en la figura 4.5.15.

4.6. Conclusiones

Se ha caracterizado el centro activo de la Hasa *DvH* identificando los diferentes estados redox mediante FTIR. Se han detectado dos isoformas diferentes del centro activo que pueden coincidir con los dos confórmers mayoritarios del centro activo identificados en la estructura cristalina de la hidrogenasa (Marques, M. C.y col., 2010). La Hasa *DvH* presenta dos estados oxidados e inactivos, Ni-IS y Ni-OX, que no pueden ser comparados con los

estados oxidados de otras hidrogenasas de [NiFe], mientras que los estados reducidos y activos, Ni-R y Ni-C, sí pueden compararse.

La Hasa *DvH* oxidada no cataliza la reacción de intercambio isotópico D_2/H^+ . Además, la presencia de O_2 inhibe su actividad catalítica, por lo que las hidrogenasas de [NiFeSe] son sensibles a pequeñas cantidades de O_2 , oxidándose a las formas inactivas. En presencia de CO se inhibe completamente la reacción de intercambio isotópico. En este caso, la inhibición es causada por la coordinación del CO extrínseco al centro activo, en concreto al átomo de Ni. Esta coordinación del CO extrínseco al centro activo no se produce en el estado oxidado.

Se ha inmovilizado Hasa *DvH* covalentemente sobre electrodos de Au-4-ATP obteniéndose TED. Sin embargo, las densidades de corriente de oxidación de H_2 obtenidas fueron bajas, probablemente debido a la pérdida de la cadena hidrofóbica. Este resultado hizo necesario generar una bicapa de fosfolípidos sobre una superficie de Au-NH₂ que permitió inmovilizar la Hasa *DvH* a través de su cadena hidrofóbica, quedando expuesta la zona cercana al “cluster” [4Fe4S] distal hacia la disolución. En esta configuración del electrodo de Hasa *DvH* es necesario el empleo de mediadores redox para poder obtener transferencia electrónica entre la enzima y el electrodo, ya que el centro sulfoférrico distal queda demasiado lejos del electrodo para TED.

Se ha diseñado una estrategia de coinmovilización en un solo paso de la Hasa de membrana y fosfolípidos para orientar adecuadamente la Hasa *DvH* y obtener TED. En esta estrategia el “cluster” sulfoférrico distal se orientó hacia la superficie del electrodo y la cadena hidrofóbica se insertó sobre una bicapa de fosfolípidos generada sobre la monocapa de la Hasa *DvH*, tal como confirmó el estudio de AFM. Además, las medidas electroquímicas mostraron que mediante esta estrategia la gran mayoría de moléculas activas sobre el electrodo presentan una orientación adecuada para TED. La densidad de corriente de oxidación de H_2 fue $80 \mu A/cm^2$, mientras que la obtenida por unión covalente de la Hasa en ausencia de fosfolípidos fue sólo $18 \mu A/cm^2$. Esos resultados confirman que la alta actividad catalítica de la Hasa de membrana requiere la presencia de la cadena hidrofóbica.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, LACASA

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, LACASA

5.1. Electrodo de carbono

En este capítulo se describe y discute la optimización de la inmovilización de lacasa *Th* sobre electrodos de carbono para el diseño de un biocátodo de reducción de oxígeno basado en transferencia electrónica directa (TED). Para ello se estudiaron la funcionalización de la superficie con derivados de sales de diazonio y la optimización de dicho recubrimiento. Los grupos funcionales añadidos a la superficie del electrodo se utilizaron para unir la enzima al electrodo, estudiándose la orientación y la estabilidad que se obtiene al formar enlaces covalentes entre la enzima y el electrodo, con el fin de obtener y optimizar la transferencia electrónica directa. En primer lugar se estudió y optimizó la estrategia de inmovilización sobre electrodos comerciales de grafito de baja densidad (LDG), y después se empleó sobre electrodos nanoestructurados de carbono.

Los distintos electrodos modificados se caracterizaron mediante técnicas electroquímicas, estudiándose las densidades de corriente electrocatalíticas de reducción de oxígeno, la sensibilidad respecto al sustrato, la estabilidad operacional y la resistencia a haluros, inhibidores naturales de la lacasa *Th*.

5.1.1. Electrodo de grafito de baja densidad, LDG

Los electrodos LDG que se utilizaron presentan un área geométrica de 0,074 cm². El LDG se caracteriza por una porosidad del 27%, un diámetro medio de poros de 5,5 μm y una densidad de 2,22 g/cm³ (Vaz-Domínguez, C., 2009).

Las densidades de corriente medidas con estos electrodos se expresan en función del área geométrica del electrodo.

5.1.1.1. Funcionalización de electrodos LDG

Los electrodos LDG se modificaron electroquímicamente del mismo modo que los electrodos de carbono HOPG (Figura 5.1.1), tal como se describe en el apartado 4.3.1. Este método permite generar una monocapa de grupos 4-aminofenilos en la superficie del electrodo LDG para la posterior inmovilización de la lacasa por enlaces covalentes.

A pesar de reproducir el método descrito para los electrodos HOPG, aparecen diferencias en la respuesta que ofrece el LDG. En primer lugar la onda de reducción de la sal de diazonio que se obtiene durante la modificación en estos electrodos (Figura 5.1.1) es mucho menos pronunciada que en los electrodos HOPG (Figura 4.4.1), debido a la estructura porosa del LDG. Esto hace que se recubra en proporción menos área del electrodo LDG respecto al total de su área electroactiva. Además, la onda de reducción en LDG aparece a potenciales más positivos, indicando que los carbonos de los electrodos LDG son más reactivos que los carbonos presentes en los electrodos planos HOPG para la reducción de la sal de diazonio.

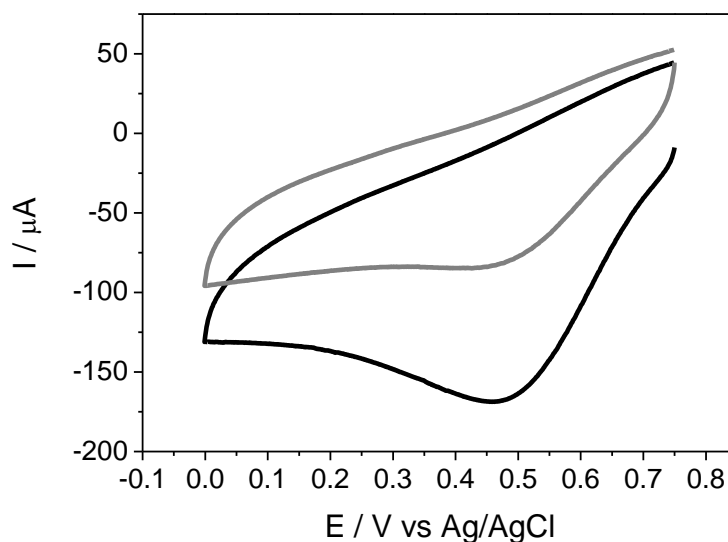


Figura 5.1.1. Voltamperometría cíclica de reducción de sal de diazonio 4-nitrofenilo 2mM en acetonitrilo, Bu_3NBF_4 0,1M sobre un electrodo LDG. Se realizaron dos ciclos, el primer ciclo se representa en negro y el segundo en gris. La velocidad de barrido empleada fue 0,2 V/s.

La segunda etapa de la modificación, tal y como se describe en el apartado 4.3.1, consistió en reducir electroquímicamente los grupos nitro de la superficie del LDG a grupos amino (Figura 5.1.2).

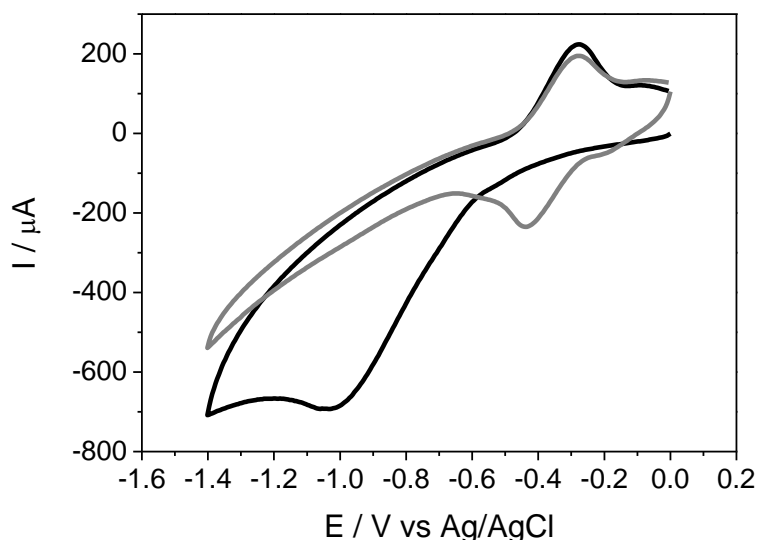


Figura 5.1.2. Voltamperometría cíclica de la reducción de los grupos 4-nitrofenilos de la monocapa a 4-aminofenilos en una disolución de $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ 9:1 con KCl 0,1 M. La velocidad de barrido fue 0,2 V/s. El color negro corresponde al primer ciclo y el gris al segundo ciclo.

La separación de picos anódico y catódico de la señal proveniente del par redox $\text{ArNO}/\text{ArNHOH}$ ($\Delta E_{\text{picos}}=166$ mV) es muy superior al valor obtenido para los electrodos HOPG ($\Delta E_{\text{picos}}=90$ mV) y al teórico para una especie confinada en la superficie del electrodo ($\Delta E_{\text{picos}}=0$ mV). Este resultado indica que existe una limitación cinética del proceso redox $\text{ArNO}/\text{ArNHOH}$, que dicha limitación es mayor para los electrodos de LDG que para el HOPG. La estructura porosa podría favorecer la formación de multicapas en mayor grado que en el caso del electrodo HOPG, de modo que la transferencia electrónica de una porción de grupos ArNHOH tuviera lugar a una distancia mayor del electrodo, y en consecuencia fuera más lenta.

Para intentar minimizar la separación de picos que presenta la señal redox de las hidroxilaminas se modificaron los electrodos con la sal de diazonio dejando que reaccionen espontáneamente, sin aplicar ningún potencial redox (Adenier, A.y col., 2005). En estos experimentos se estudió el tiempo de inmersión en diferentes medios de reacción, tal y como se detalla en la Tabla

5.1.1. Luego se caracterizó la separación de picos del proceso electroquímico ArNO/ArNHOH para determinar el grado de recubrimiento y la reversibilidad del proceso.

Tiempo de inmersión (min)	Reducción de grupos nitro	NH ₂ (%)	ΔE_{picos} (mV)
3	H ₂ SO ₄ (0,1M)	34,67	185
3	EtOH/H ₂ O	42,03	111
5	H ₂ SO ₄ (0,1M)	45,55	145
5	EtOH/H ₂ O	53,50	131
8	H ₂ SO ₄ (0,1M)	63,95	191
8	EtOH/H ₂ O	49,80	125
10	H ₂ SO ₄ (0,1M)	40,9	153
10	EtOH/H ₂ O	61,95	175
15	H ₂ SO ₄ (0,1M)	63,77	177
15	EtOH/H ₂ O	69,50	126
30	H ₂ SO ₄ (0,1M)	57,15	162
30	EtOH/H ₂ O	66,40	142
Modificación electroquímica	H ₂ SO ₄ (01M)	62,55	177
Modificación electroquímica	EtOH/H ₂ O	78,33	166

Tabla 5.1.1. Comparación de resultados obtenidos en la modificación espontánea de electrodos LDG por inmersión en una disolución de sal de diazonio 4-nitrofenilo 10 mM en acetonitrilo durante diferentes tiempos con los resultados obtenidos por modificación electroquímica. La reducción de los grupos nitro a amino se realizó en H₂SO₄ 0,1 M o en EtOH/H₂O 1:9 con KCl 0,1 M. También se muestra el porcentaje de grupos amino en la monocapa final y la separación de picos que presenta la señal redox de las hidroxilaminas.

Los recubrimientos de las monocapas sobre los electrodos LDG se expresan en porcentaje de grupos amino y no en función del área del electrodo, ya que la superficie real puede variar mucho de un electrodo a otro debido a la estructura porosa que presentan.

En general se obtiene mediante el método de unión espontáneo una menor separación de picos del proceso redox de las hidroxilaminas, como indican los valores de la Tabla 5.1.1, pero con el inconveniente de que el porcentaje de grupos amino generado e incorporado a la superficie también es algo menor, independientemente de la disolución empleada para la reducción de los grupos 4-nitrofenilos. Se optó por generar un porcentaje mayor de grupos amino, estableciendo las siguientes condiciones para modificar los electrodos de LDG para experimentos posteriores: una primera etapa de reducción electroquímica de la sal de diazonio 4-nitrofenilo y una segunda etapa de reducción electroquímica en EtOH/H₂O, en lugar de H₂SO₄ 0,1 M como se empleaba para los electrodos HOPG.

5.1.1.2. Inmovilización de lacasa sobre electrodos LDG-NH₂

Con el fin de optimizar la inmovilización de lacasa *Th* sobre electrodos de LDG-NH₂ se hizo el estudio comparativo de las inmovilizaciones en una sola etapa desarrolladas previamente en el laboratorio, bien por formación de enlaces enzima-electrodo tipo amida o tipo imina (Vaz-Domínguez, C., 2009), frente a un método en dos etapas que combine secuencialmente ambos tipos de unión covalente. Mediante la estrategia en dos etapas de inmovilización se pretendió favorecer la orientación óptima de la lacasa sobre el LDG-NH₂ para obtener TED, y a la vez mejorar la estabilidad de la enzima inmovilizada.

Inmovilización de lacasa en una sola etapa:

El primer método empleado fue la formación de un enlace amida entre los grupos amino del LDG-NH₂ y los ácidos carboxílicos de los aminoácidos Asp y Glu presentes en la superficie de la enzima, los cuales fueron activados con NHS y ECD (Vaz-Dominguez, C.y col., 2008). En primer lugar se depositó

la lacasa sobre el LDG-NH₂ durante 30 minutos. El pH de la disolución que contiene la enzima es inferior a 7, por lo que la monocapa de grupos amino se encuentra protonada (Bryant, M. A.y col., 1993). Por otro lado, la lacasa *Th* presenta un punto isoeléctrico de 4,2 (Shleev, S. V.y col., 2004), por lo que las interacciones electroestáticas favorecen la incorporación de la enzima a la superficie del LDG-NH₂ y su orientación de acuerdo a su distribución de cargas superficiales, como ocurre con la enzima hidrogenasa (Rudiger, O.y col., 2005). Posteriormente, tal y como se indica en la sección 3.2.7.1, se añadieron los reactivos NHS y EDC para activar los ácidos carboxílicos de la lacasa *Th* adsorbida y provocar su unión covalente con el electrodo LDG-NH₂.

La inmovilización mediante formación de enlaces imina se desarrolló como se detalla a continuación. Primeramente se incubó la lacasa en presencia del oxidante NaIO₄ para oxidar los grupos hidroxilos de los residuos glicosilados a aldehídos. Esta disolución se llevó a pH neutro y se depositó sobre el electrodo LDG-NH₂, produciéndose la reacción de los aldehídos de la lacasa *Th* con los grupos amino de la monocapa, formándose enlaces imina o bases de Schiff (Gupta, G.y col., 2004).

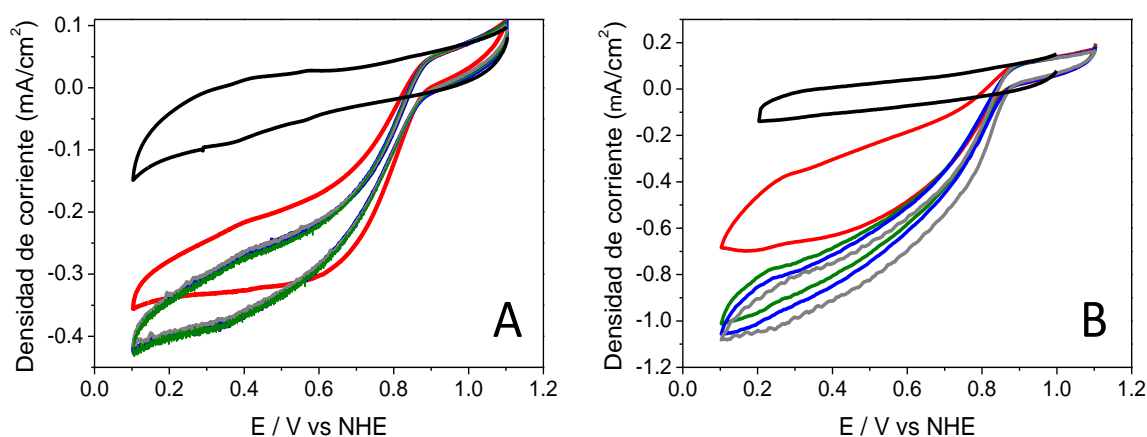


Figura 5.1.3. Voltamperogramas cíclicos de un electrodo LDG modificado con lacasa mediante la formación de un enlace amida (A) y mediante la formación de bases de Schiff (B). La velocidad de rotación del electrodo fue 0 (rojo), 500 (verde), 1000 (azul), 1500 (gris) rpm. El ciclo de color negro se realizó en presencia del inhibidor NaF. Las medidas se realizaron a una velocidad de barrido de 10 mV/s. El tampón de medida fue acetato 50 mM, NaClO₄ 100 mM, pH 4,2, 27 °C y saturado con O₂.

Ambos tipos de electrodos se caracterizaron electroquímicamente. En la Figura 5.1.3 se muestran los resultados para la reducción electroenzimática de O_2 por la lacasa inmovilizada por enlace amida (A) ó por enlace imina (B), mostrándose en cada caso la inhibición por fluoruros y el efecto que se produce al rotar el electrodo y eliminar así la limitación por transferencia de carga. Los voltamperogramas en presencia de 1 atm de O_2 manifiestan un claro efecto electrocatalítico, que produce un incremento en la intensidad de corriente en el sentido de reducción. El voltamperograma adquiere una forma sigmoideal y alcanza un pseudo plató en la intensidad de corriente. Además, el barrido de potenciales del segmento oxidativo del ciclo carece de onda de oxidación. Estos valores de corriente se deben a la reducción de oxígeno catalizada por la lacasa, ya que cuando se añade NaF, inhibidor de la lacasa, el proceso catalítico desaparece.

Tomando como corriente de fondo la voltamperometría realizada en presencia del inhibidor NaF, se aprecia que la reducción bioelectrocatalítica de O_2 comienza a 870 mV vs NHE independientemente del método de inmovilización. El potencial medio de la onda catalítica está muy próximo al valor del potencial formal del centro T1 de la lacasa *Th*, 780 mV vs. NHE (Reinhammar, B. R. M., 1972) (Xu, F. y col., 1996b).

Los resultados electroquímicos indican que se obtiene TED entre la enzima y el electrodo modificado a altos potenciales redox por ambos métodos, por lo que se concluye que un porcentaje elevado de moléculas de lacasa inmovilizadas sobre el electrodo se encuentran orientadas con el centro T1 de cobre dirigido hacia el electrodo.

La variación de la velocidad de rotación del electrodo no varía la densidad de corriente catalítica obtenida en el electrodo modificado con enlace amida (Figura 5.1.3.A) y apenas varía cuando se modificó mediante bases de Schiff (Figura 5.1.3.B), lo que indica que el proceso no se encuentra limitado por el aporte de O_2 al electrodo. Solo se aprecia limitación por transporte de masa cuando la medida se realizó con el electrodo estacionario. Esto se atribuye a la aparición de un gradiente de difusión de O_2 en este caso, causado por la alta actividad catalítica de la lacasa *Th*, que consume todo el O_2 en las proximidades del electrodo.

Cuando la inmovilización se realizó mediante enlaces amida la corriente catalítica alcanza $-370 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ a $0,4 \text{ V}$ vs NHE y 1500 rpm , un aumento del 20 % respecto a las medidas en estado estacionario. Por otro lado, con el electrodo modificado mediante bases de Schiff se obtuvo un notable aumento de la respuesta bioelectrocatalítica de reducción de O_2 , $-880 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ a $0,4 \text{ V}$ vs NHE y 1500 rpm . Esta diferencia se puede atribuir a dos causas: (a) la inmovilización por enlaces imina permite que se haya inmovilizado más enzima activa o (b) la orientación de la enzima inmovilizada por enlaces imina favorece la TED.

Para discernir si la causa es la orientación o la posible pérdida de actividad se estudió la electroquímica por transferencia electrónica mediada (TM). Para ello se añadió el mediador redox ABTS en la disolución de medida saturada con O_2 y se midió la corriente catalítica por cronoamperometría a un potencial aplicado de $0,4 \text{ V}$ vs NHE (Figura 5.1.4). La corriente catalítica en presencia de ABTS es proporcional al número total de moléculas de lacasa activas sobre la superficie del electrodo, independientemente de su orientación.

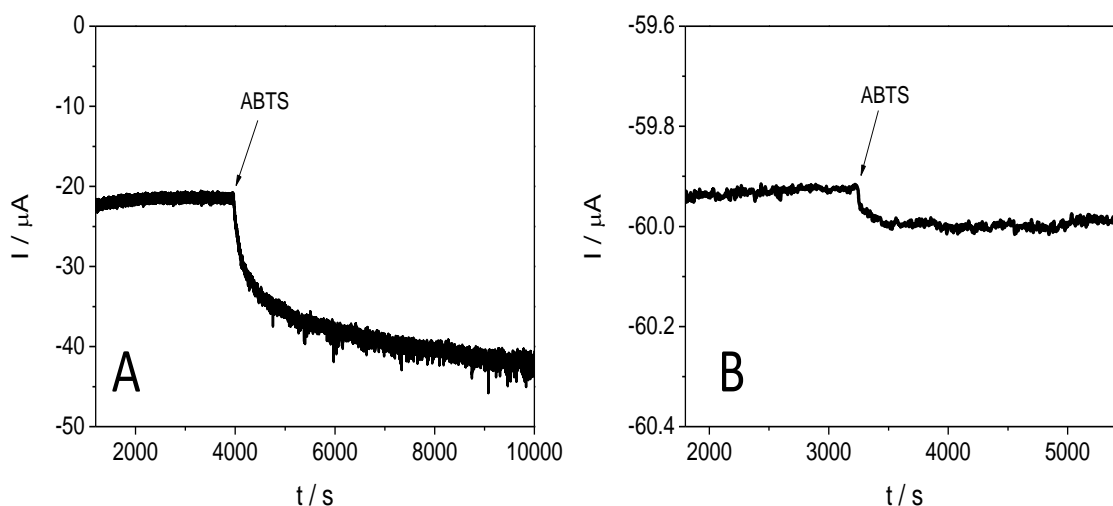


Figura 5.1.4. Efecto de la adición de ABTS $0,2 \text{ mM}$ en el tampón de medida sobre la corriente catalítica de reducción de O_2 de un electrodo LDG modificado con lacasa A) mediante la formación de enlace amida y B) mediante la formación de bases de Schiff. La medida se hizo mediante cronoamperometría a $0,4 \text{ V}$ vs NHE y rotando el electrodo a 500 rpm y bajo O_2 .

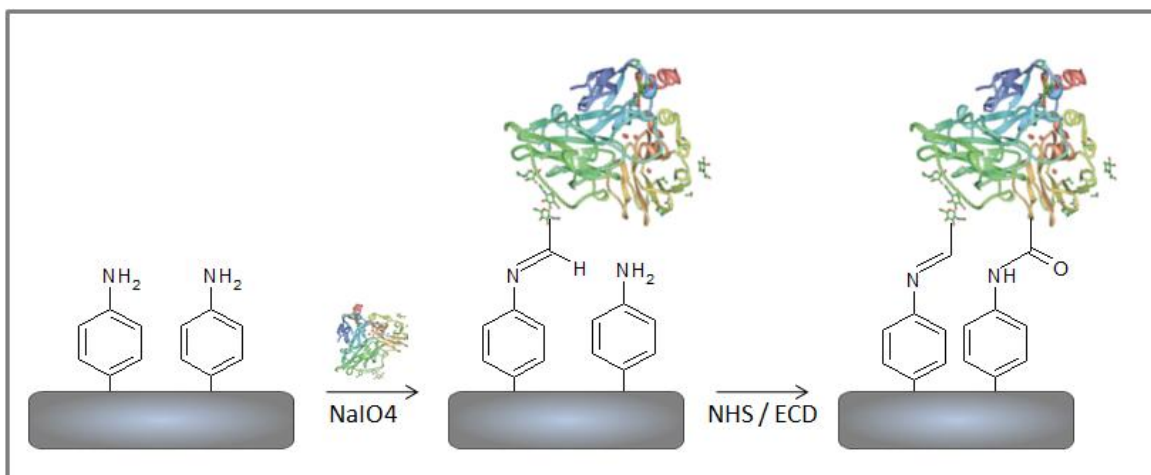
Si se comparan las corrientes medidas en ausencia y en presencia de mediador redox en el caso de lacasa unida covalentemente por enlaces amida

(Figura 5.1.4 A), se observa que aumenta la corriente un 100 % después de añadir ABTS. Este resultado indica que existe una proporción significativa de moléculas de lacasa orientadas incorrectamente e incapaces de establecer TED con el electrodo. Sin embargo, la corriente medida para el electrodo enzimático formado por bases de Schiff apenas sufre un aumento significativo (<2%) en presencia de ABTS (Figura 5.1.4 B). Por lo tanto, la mayor corriente catalítica medida por TED obtenida con la inmovilización de lacasa mediante bases de Schiff se debe fundamentalmente a un mayor porcentaje de moléculas de lacasa con una orientación adecuada sobre el electrodo. Este resultado es coherente con la estructura característica de la lacasa *Th*, ya que esta lacasa presenta una distribución superficial de cargas donde predominan las negativas y solamente hay una pequeña región cargada positivamente en las proximidades del centro T1 (Polyakov, K. M.y col., 2009). Debido a esta estructura externa, cuando se inmoviliza a través de sus grupos carboxílicos es de esperar que sólo una parte de las moléculas de lacasa se encuentren orientadas correctamente con el centro de cobre T1 en contacto con el electrodo. La otra población de lacasa necesita la presencia de un mediador redox para catalizar la reducción de O₂, ya que no se encuentra con la orientación adecuada para realizar TED. Por otro lado, la lacasa *Th* presenta la mayoría de sus carbohidratos próximos al centro T1 (Piontek, K.y col., 2002). Por lo que al realizar la inmovilización mediante la formación de bases de Schiff a través de estos grupos se favorece la orientación de la enzima inmovilizada con su centro T1 próximo a la superficie del electrodo. Debido a esto, la corriente catalítica directa y mediada son similares.

Inmovilización en dos etapas mediante formación de bases de Schiff y posterior formación de enlace amida:

Para realizar la inmovilización en dos etapas en primer lugar se inmovilizó la lacasa por bases de Schiff, como se ha descrito en el apartado anterior, permitiendo una orientación adecuada de la enzima sobre el electrodo para obtener TED. Posteriormente, el electrodo modificado con la enzima se incubó en presencia de NHS/ECD para formar enlaces amida entre los grupos

carboxílicos de la lacasa y los grupos amino de la monocapa que han quedado sin reaccionar en la primera etapa (Esquema 5.1.1).



Esquema 5.1.1. Representación de la inmovilización de lacasa en dos etapas sobre un electrodo LDG modificado con grupos 4-aminofenilos.

En la Figura 5.1.5. se muestran los resultados obtenidos con el electrodo modificado en dos etapas al medir la reducción bioelectrocatalítica de O_2 mediante voltamperometría cíclica.

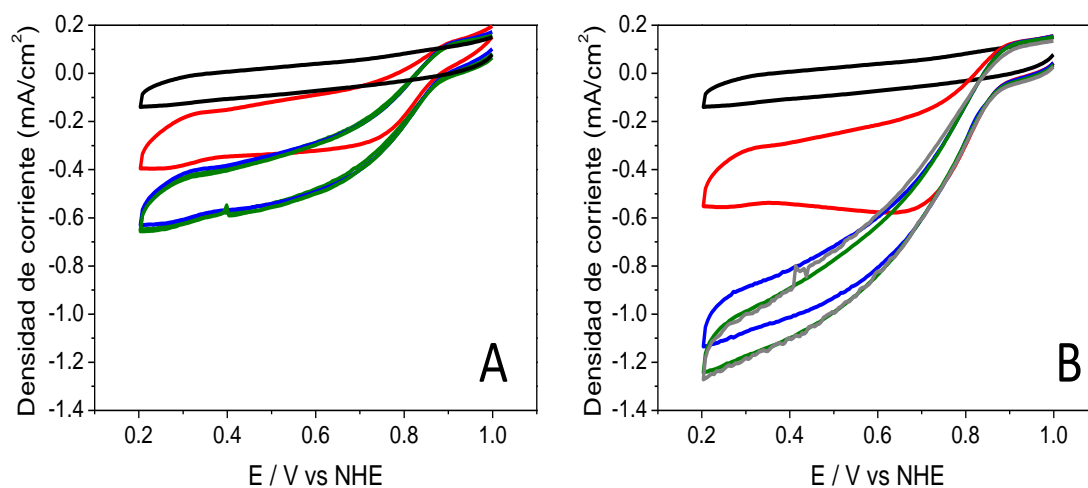


Figura 5.1.5. Respuesta bioelectrocatalítica de un electrodo LDG con lacasa inmovilizada en dos etapas. La velocidad de rotación del electrodo fue 0 (rojo), 500 (azul), 1000 (verde) ó 1500 (gris) rpm. El ciclo de color negro se realizó en presencia del inhibidor NaF. La gráfica A muestra las medidas realizadas al aire y la gráfica B a las realizadas bajo O_2 . La velocidad de barrido fue 10 mV/s. El tampón empleado fue acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM, pH 4,2 y la temperatura 27 °C.

Utilizando de nuevo como corriente de fondo la obtenida al inhibir la enzima con NaF (color negro), en la Figura 5.1.5 A y B se obtiene que la reducción electroenzimática de O_2 comienza a 870 mV vs NHE.

La rotación del electrodo a 500 rpm provoca un aumento en las densidades de corriente que llega hasta valores del doble de densidad de corriente catalítica respecto a las voltamperometrías realizadas sin rotación, tanto al aire como bajo saturación de O_2 . Sin embargo, un incremento mayor de la velocidad de rotación del electrodo lleva a densidades de corriente similares a las ya obtenidas a baja velocidad de rotación. Estos resultados son debidos a que cuando la medida se realiza en condiciones estacionarias se produce un fenómeno de control del proceso catalítico por difusión del sustrato. Se observa (ciclo de color rojo) como rápidamente la corriente catalítica de reducción de O_2 aumenta hasta que llega a un punto a 650 mV vs NHE, valor en el cual vuelve a disminuir. Esta disminución es debida a que la actividad catalítica de la lacasa agota el O_2 en las proximidades del electrodo. Al rotar el electrodo se elimina la limitación por difusión, de forma que el O_2 no se agota durante la medida.

Cuando las medidas se realizaron en tampón saturado en O_2 aumentan notablemente las corrientes catalíticas respecto a las que se realizaron con el tampón al aire (Figura 5.1.5 B), ya que la constante de Michaelis-Menten de la lacasa *Th* por el O_2 es alta ($K_M^{O_2} = 0,3$ mM) (Vaz-Domínguez, C., 2009). Las densidades de corriente catalíticas medidas cuando se alcanza el plató (o pseudo-plató) son similares a las obtenidas cuando el electrodo se modificó sólo mediante la formación de bases de Schiff, $-1,1$ mA/cm² a 0,4 V vs NHE, bajo O_2 y a 1500 rpm. También se aprecia que mediante la inmovilización en dos etapas la densidad de corriente catalítica medida a 0,8 V vs NHE, cuando el sobrepotencial respecto al potencial formal de la enzima es muy pequeño, es casi el doble respecto al obtenido con lacasa inmovilizada solo por bases de Schiff (Tabla 5.1.2). Las corrientes biocatalíticas más altas a sobrepotenciales menores indican una TED más eficaz cuando la lacasa se inmoviliza en dos etapas, que proporciona un aumento de la densidad de corriente del 77 % a 0,8 V vs NHE. Cabe resaltar este resultado para su posible aplicación como cátodo de reducción de O_2 en una biopila de combustible, gracias a sus altas corrientes catalíticas obtenidas a altos potenciales redox. De este modo el

potencial obtenido en la biopila, dado por la diferencia entre el potencial del cátodo -donde se realiza la reducción- y el potencial del ánodo -donde se realiza la oxidación- será mayor.

	0,4 V vs NHE (500 rpm, O ₂)	0,8 V vs NHE (500 rpm, O ₂)
Enlace (Base de Schiff)	-(861 ± 17) μA	-(155,6 ± 2) μA
Enlace (Base de Schiff + NHS/ECD)	-(924 ± 14) μA	-(275,1 ± 4,3) μA

Tabla 5.1.2. Comparación de densidades de corriente catalítica medidas con electrodos LDG modificados mediante diferentes métodos de inmovilización de lacasa *Th*.

La estrategia de inmovilización covalente de lacasa en dos etapas desarrollada es bastante favorable si la comparamos con aquellos resultados publicados sobre inmovilización de lacasa en electrodos de carbono modificados con polímeros redox conteniendo complejos de osmio (Ackermann, Y.y col., 2010) (Rengaraj, S.y col., 2011) o ABTS (Karnicka, K.y col., 2008), que dan lugar a una disminución en el potencial al cual se produce la bioelectro-reducción de O₂. Además, en estos casos la degradación paulatina del mediador redox inmovilizado puede disminuir su estabilidad, la cual es importante para estudiar posibles aplicaciones en biopilas de combustible.

Se realizaron en ausencia del sustrato O₂, dentro de la cámara anaerobia y en presencia del inhibidor fluoruro, experimentos para detectar señales redox no catalíticas de la lacasa, cuyos resultados se muestran en la Figura 5.1.6. La técnica empleada fue la de diferencial de pulsos, que consiste en aplicar un potencial redox que varía de manera lineal con el tiempo, midiendo la corriente sólo al principio y al final de cada de pulso de potencial, grabando la diferencia como resultado. Se obtienen por esta técnica curvas que recuerdan a la primera derivada de una muestra de corriente continua aunque con un pico (Pita, M., y col., 2002). Mediante este método se minimiza la corriente capacitiva que se mide mediante voltamperometría cíclica, donde es muy difícil distinguir de la corriente de fondo

las señales faradaicas debidas a la oxidación y reducción de los centros de cobre de la lacasa.

El proceso redox de transferencia electrónica no catalítica que se pretendía detectar es entre el centro T1 de la lacasa y el electrodo. La integración de la señal obtenida permitiría conocer la cantidad de enzima que se encuentra orientada sobre la superficie del electrodo para la TED. Sin embargo, no se apreciaron señales no catalíticas por diferencial de pulsos que se puedan atribuir a los centros de cobre (Figura 5.1.6). Se debe probablemente a la pequeña cantidad de lacasa inmovilizada sobre el electrodo, ya que cuando los recubrimientos de enzima son por debajo de 3-4 pmol/cm² es muy difícil detectar señales redox no catalíticas (Sosna, M.y col., 2010). En consecuencia, sólo podemos concluir que el recubrimiento de enzima inmovilizada y capaz de realizar TED no es superior a 3-4 pmol/cm². En todo caso, recubrimientos mayores no son esperables para una monocapa de enzima unida covalentemente a un electrodo (Pershad, H. R.y col., 1999) (Sosna, M.y col., 2010).

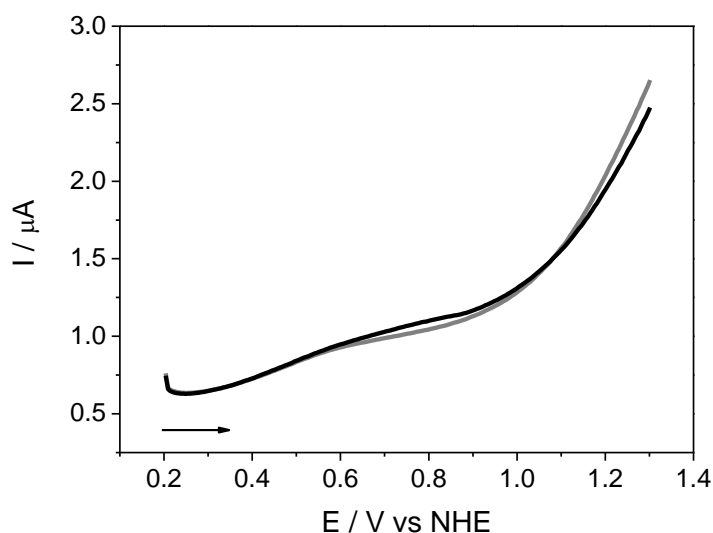


Figura 5.1.6. Medidas de diferencial de pulsos de electrodo LDG modificado con lacasa en dos etapas. La línea de color negro corresponde a la medida que se realizó en la cámara anaerobia bajo N₂ y la línea de color rojo después de añadir F⁻ 30 mM. Las medidas se realizaron en tampón acetato 50 mM, NaClO₄ 100 mM, pH 4,2. La flecha indica el sentido del barrido de potencial. Las condiciones de la medida fueron: intervalo de tiempo 0,1 s, salto de potencial 0,005 V y una amplitud de 0,025 V.

5.1.1.3. Estabilidad operacional

Se comparó la estabilidad bajo condiciones operacionales de electrodos LDG modificados con lacasa por dos de los métodos descritos en el apartado anterior: la inmovilización de lacasa en una etapa mediante formación de bases de Schiff y la inmovilización realizada en dos etapas. Se siguió la estabilidad operacional por cronoamperometría a 0,4 V vs NHE durante seis días, midiendo de manera continua en presencia de 1 atm de O₂ y con rotación del electrodo a 500 rpm (Figura 5.1.7)

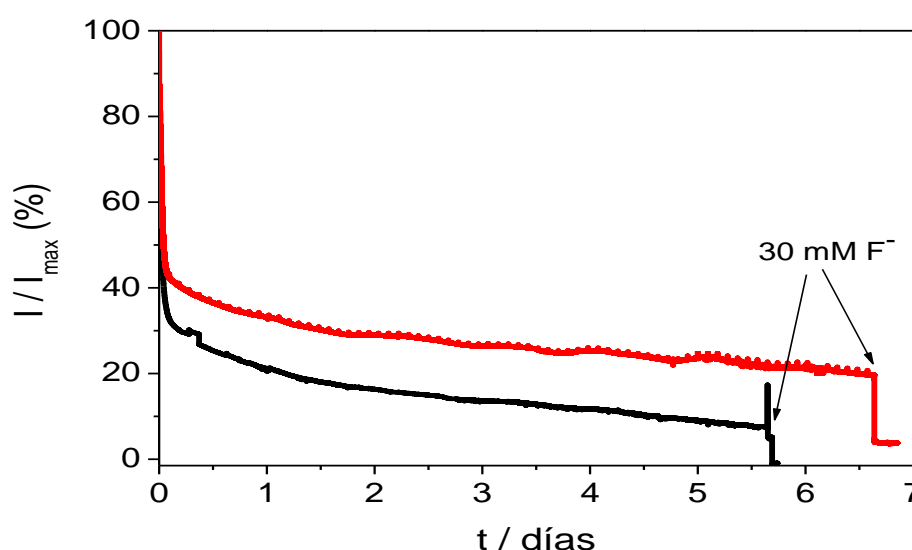
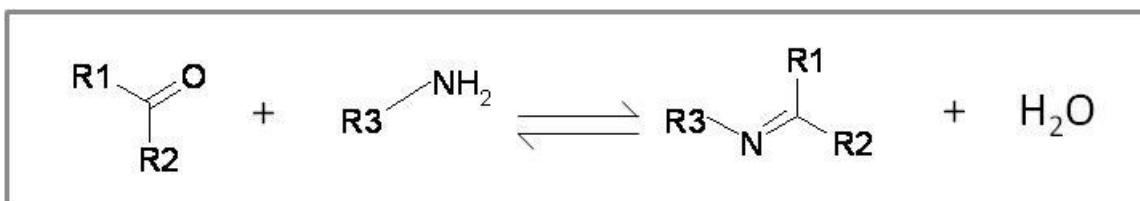


Figura 5.1.7. Estabilidad operacional de la lacasa *Th* inmovilizada sobre un electrodo LDG en una etapa mediante la formación de bases de Schiff (color negro) o en dos etapas (color rojo). Las medidas se realizaron mediante cronoamperometría a 0,4 V vs NHE, 500 rpm, bajo 1 atm de O₂. El tampón de medida fue acetato 50 mM, NaClO₄ 100 mM, pH 4,2, 27 °C.

Se observa como durante las primeras horas, independientemente del tipo de inmovilización, hay una pérdida significativa de la corriente inicial. Probablemente esta cinética inicial corresponda a moléculas de lacasa unidas solo por bases de Schiff, ya que la formación del enlace imina (-N=C-) en medio acuoso tiende a hidrolizarse con facilidad. La formación de la base de Schiff tiene lugar mediante la siguiente reacción reversible:



Sin embargo, se aprecia en la Figura 5.1.7 como la formación de enlaces amidas en el método de dos etapas aporta mayor estabilidad operacional al electrodo a tiempos largos, ya que este tipo de enlace requiere condiciones más drásticas para su hidrólisis. Así, después de más de cinco días en los que ambos electrodos estuvieron trabajando en continuo, el electrodo que se modificó con lacasa mediante formación de bases de Schiff sólo mantiene el 7,63 % de la corriente inicial, mientras que el que se inmovilizó en dos etapas mantiene el 22,43 % de corriente.

Se añadió al final de cada experimento 30 mM de NaF, inhibidor de la lacasa, para comprobar que la corriente electrocatalítica medida era debida a la enzima inmovilizada sobre el electrodo.

5.1.1.4. Inhibición por haluros de los electrodos de lacasa

Para la aplicación de electrodos de lacasa como biocátodos implantables *in vivo*, ya sea como cátodo de una biopila de combustible o como biosensor de O_2 , es un requisito necesario que el electrodo pueda operar en presencia de una concentración de cloruros de aproximadamente 140 mM. La concentración de NaCl presente en el suero humano se encuentra en el intervalo 90-150 mM (Coman, V.y col., 2010).

Para estudiar el efecto que el ión cloruro produce en la corriente catalítica de un electrodo modificado con lacasa mediante dos etapas, se realizó una cronoamperometría añadiendo en la celda electroquímica diferentes alícuotas de una disolución de NaCl 1 M, como se muestra en la Figura 5.1.8.

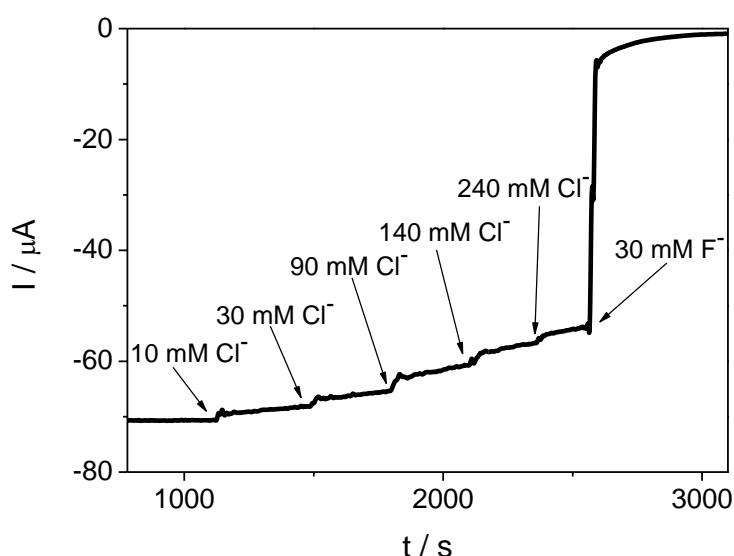


Figura 5.1.8. Efecto de la adición de Cl^- en el medio sobre la corriente catalítica de un electrodo LDG modificado con lacasa en dos etapas. Se estudió por cronoamperometría a 0,4 V vs NHE y rotación del electrodo a 500 rpm. El tampón de medida fue acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM, pH 4,2 y temperatura de 27 °C.

Cuando se añadió una concentración de 140 mM de Cl^- la intensidad de corriente se vio reducida en un $(17 \pm 5) \%$ de media respecto de la corriente inicial para varios electrodos de lacasa preparados.

Experimentos realizados anteriormente en el laboratorio con lacasa *Th* inmovilizada solo a través de enlaces amida mostraron una resistencia mayor a la inhibición causada por una concentración de Cl^- 140 mM que la obtenida en el método por dos etapas (Vaz-Dominguez, C.y col., 2008).

En el caso citado, concentraciones superiores de Cl^- apenas afectaban la corriente catalítica. La alta resistencia a cloruros descrita por Vaz-Domínguez y cols. Se puede deber al lote de enzima empleado, que puede presentar diferencias en la composición a raíz del proceso de purificación, dificultando la penetración de los cloruros en la estructura de la enzima. Para dilucidar esta hipótesis se realizaron experimentos inmovilizando la enzima en las mismas condiciones que Vaz y cols., es decir mediante un enlace amida empleando tampón fosfato en lugar de MES durante la inmovilización covalente con NHS y EDC. Se observó que la actividad electrocatalítica se inhibía un 11,1 % en presencia de NaCl 140 mM, mientras que cuando se usaba tampón MES en las

mismas condiciones aumentaba la inhibición a un 14,2 %. A raíz de este resultado, la mayor resistencia a cloruros observada al usar fosfato se explica por la capacidad del fosfato para reaccionar con grupos funcionales amino de la enzima en presencia de NHS/EDC protegiendo la zona cercana al centro T1 de la inhibición por Cl^- . Así mismo, se trató de disminuir la inhibición de Cl^- , inmovilizando lacasa por enlaces amida en tampón MES y posteriormente incubarla en tampón fosfato. Dicho electrodo consiguió mantener un 93.3% de la actividad inicial cuando la concentración de ion cloruro fue de 140 mM.

Muy recientemente se han publicado trabajos de otros grupos de investigación en los que se proponen soluciones alternativas a la aquí presentada para minimizar la inhibición por Cl^- de los electrodos de lacasa. El grupo de W. Schuhmann ha reportado electrodos de grafito modificados con lacasa inmovilizada por atrapamiento con polímeros redox cargados con complejos de osmio, dichos complejos sirven como mediador para un biocátodo y presentan el efecto adicional de bloquear el acceso de iones cloruro al centro T1 del enzima (Beyl, Y.y col., 2011). Por otro lado, Zebda y cols. han conseguido minimizar la inhibición por cloruro al 5 % al atrapar la lacasa dentro de una matriz de nanotubos de carbono (CNT) depositados sobre el electrodo (Zebda, A.y col., 2011). Estos artículos corroboran los resultados anteriores de nuestro grupo en los que se reportó por primera vez que se podía disminuir notablemente la inhibición por Cl^- de un electrodo de lacasa si la estrategia de inmovilización era la adecuada (Vaz-Dominguez, C.y col., 2008).

5.1.1.5. Biosensor de oxígeno

Dadas las altas densidades de corriente de reducción de O_2 medidas con los electrodos de LDG- NH_2 modificados covalentemente con lacasa, se desarrolló un biosensor amperométrico de O_2 , estudiándose la sensibilidad de respuesta frente a la concentración de O_2 en la disolución y el límite de detección. El estudio se realizó por cronoamperometría, como se muestra en la Figura 5.1.9, aplicando 0,4 V vs NHE y rotando el electrodo a 800 rpm en una disolución de acetato sódico 50 mM, NaClO_4 100 mM, pH 4,2 a 27 °C y bajo saturación de N_2 . Las medidas se realizaron en el interior de una cámara

anaerobia, donde la concentración de O_2 es menor de 0,1 ppm, para que la intensidad de corriente inicial se pudiera considerar como valor blanco. A continuación se añadieron por triplicado distintos volúmenes de tampón saturado en O_2 , desde 1 μ l hasta 100 μ l, como se muestra en la Figura 5.1.9 A. Se observa cómo el electrodo presenta una respuesta rápida y proporcional a las adiciones de tampón saturado en O_2 .

La dependencia de la densidad de corriente frente a la concentración de O_2 se determinó por substracción del valor inicial de corriente en ausencia de O_2 a la respuesta del electrodo obtenida mediante cronoamperometría. Debido al ruido generado en la señal eléctrica al realizar las sucesivas adiciones de O_2 , que dificultan la medida de intensidad de corriente, los valores se tomaron 3 s después de cada inyección de tampón saturado de O_2 . De esta manera se minimizó el error de medida.

El límite de detección determinado para el biosensor de O_2 a partir de tres experimentos sucesivos fue de $(0,7 \pm 0,2) \mu M$ y la sensibilidad fue de $(6,4 \times 10^{-8} \pm 0,4) A/cm^2 M$.

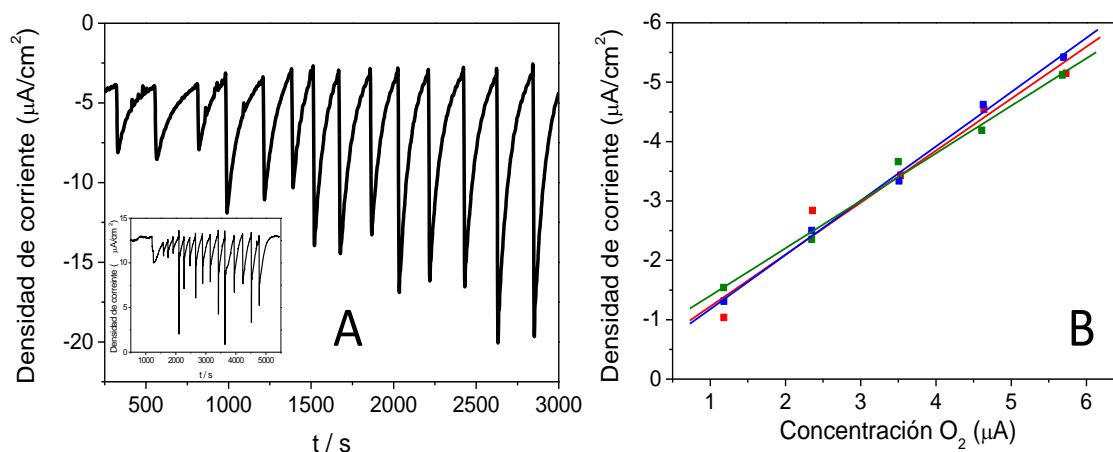


Figura 5.1.9. La figura A corresponde al cronoamperograma realizado a 0,4 V vs NHE, velocidad de rotación del electrodo de 800 rpm, en tampón acetato 50 mM, $NaClO_4$ 100 mM, pH 4,2, 27 °C, bajo N_2 y dentro de la cámara anaerobia. Las adiciones de tampón saturado con O_2 se realizaron por triplicado desde 5 μ l hasta 100 μ l. La gráfica B corresponde a las regresiones lineales de la curva de calibrado de O_2 realizada por triplicado.

El intervalo de linealidad del biosensor de O_2 se determinó a través de medidas análogas a las anteriores pero añadiendo alícuotas de tampón saturado en O_2 desde 10 μl hasta 3 ml.

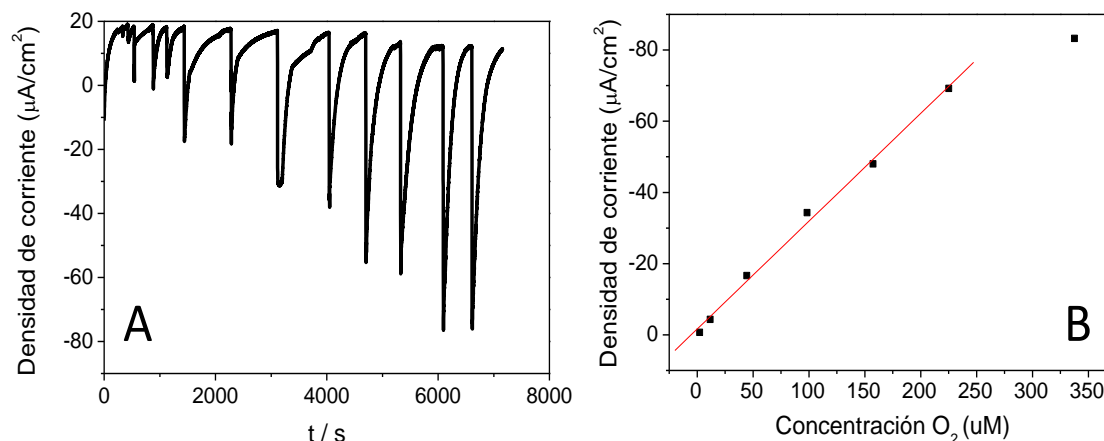


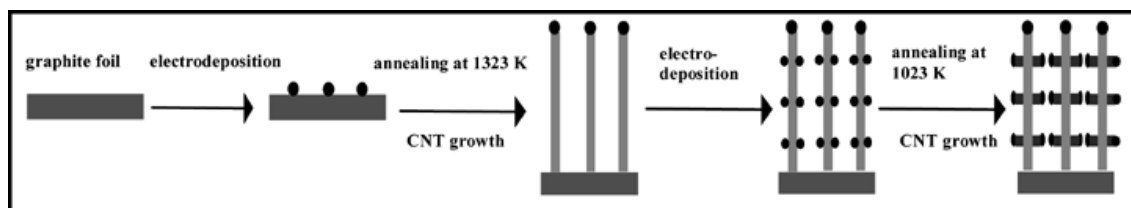
Figura 5.1.10. La figura A corresponde al cronoamperograma realizado a 0,4 V vs NHE, velocidad de rotación del electrodo de 500 rpm, en tampón acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM, pH 4,2, 27 °C, bajo N_2 y dentro de la cámara anaerobia. Las adiciones de tampón saturado con O_2 se realizaron por triplicado desde 10 μl hasta 3 ml. La gráfica B corresponde al ajuste de las medidas obtenidas a altas concentraciones de O_2 .

El intervalo de linealidad de la detección de O_2 obtenida con el electrodo de lacasa *Th* llega hasta 220 μM , lo cual corresponde aproximadamente a la concentración de saturación de una disolución acuosa en aire. Por lo tanto, el intervalo de linealidad del biosensor cubre el intervalo de concentraciones de O_2 esperables para muestras biológicas.

5.1.2. Electrodo de grafito modificado con nanotubos de carbono, 3D-CNT/CMF

Se emplearon electrodos nanoestructurados de carbono cedidos por el Prof. Wolfgang Schuhmann de la Ruhr-Universitat Bochum, Alemania. El material soporte fue grafito sobre el que se depositaron electroquímicamente nanopartículas de hierro para catalizar el posterior crecimiento de microfibras de carbón (CMF) de 500-700 nm de diámetro y con una longitud promedio de 3-6 mm por deposición química de vapor. Sobre las CMF se realizó una

segunda deposición química de vapor para el crecimiento de nanotubos de carbono (CNT) de diámetro entre 15 y 60 nm sobre las fibras de carbón, como se muestra en el Esquema 5.1.2 y en la Figura 5.1.11 (Li, N.y col., 2007).



Esquema 5.1.2. Esquema de la síntesis de los electrodos nanoestructurados por electrodeposición de hierro y posterior crecimiento de los nanotubos de carbono. Los CNT primarios se crecieron a 1323 K y los secundarios y más cortos a 1023 K. Figura tomada de la referencia (Li, N.y col., 2007).

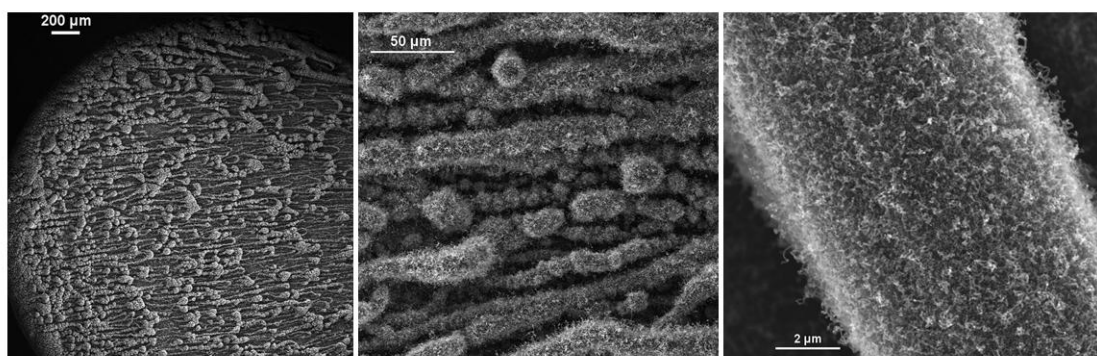


Figura 5.1.11. Imágenes de SEM de los electrodos de grafito 3D-CNT/CMF. Figura tomada de la referencia (Gutiérrez-Sánchez, C.y col., 2012).

Estos electrodos tridimensionales nanoestructurados aumentan la superficie electroactiva disponible respecto a los electrodos LDG, y además presentan una estructura ramificada y organizada de canales abiertos que facilitan la inmovilización homogénea de enzima y permiten una difusión eficiente del sustrato O_2 . Por otro lado, se esperaba que las buenas propiedades conductoras de los nanotubos de carbono multipared incorporados al electrodo y sus dimensiones nanométricas favorezcan la TED con enzimas redox inmovilizados covalentemente sobre ellos (Alonso-Lomillo, M. A.y col., 2007). Se estudió la inmovilización de la lacasa sobre los electrodos nanoestructurados utilizando las estrategias puestas a punto con los electrodos LDG descritas anteriormente.

Modificación de electrodos de grafito 3D-CNT/CMF con sales de diazonio:

Se funcionalizaron los electrodos con sal de diazonio 4-nitrofenilo mediante dos ciclos de voltamperometría cíclica (Figura 5.1.12 A) y posteriormente se redujeron electroquímicamente los grupos nitro para obtener grupos amino sobre la superficie del electrodo (3D-CNT/CMF-NH₂) (Figura 5.1.12 B).

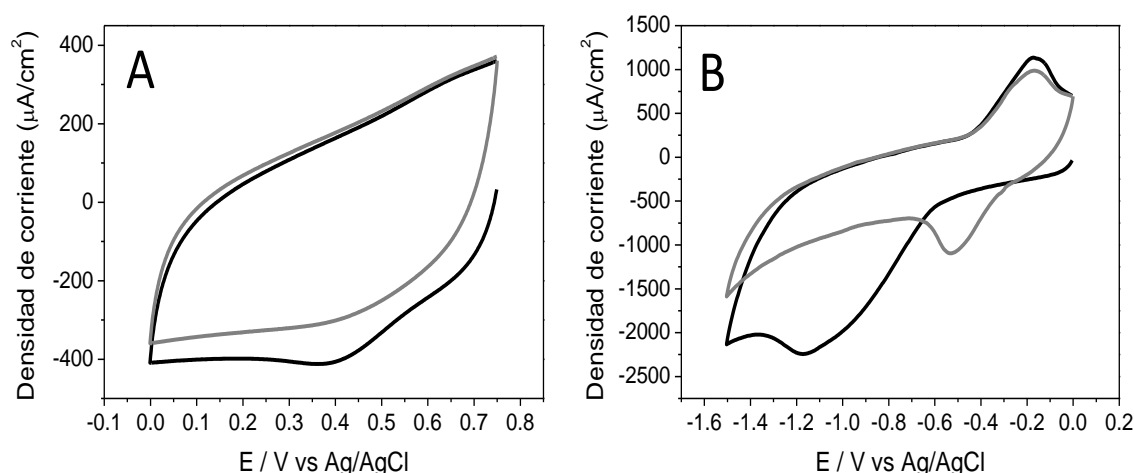


Figura 5.1.12. A) Modificación de un electrodo de grafito 3D-CNT/CMF con sal de diazonio 4-nitrofenilo 2mM en acetonitrilo, conteniendo BF₄ClO₄ 100 mM. Se realizaron dos ciclos de voltamperometría cíclica entre 0,75 y 0 V a 0,2 V/s. B) Reducción electroquímica de los grupos 4-nitrofenilos. Las medidas se realizaron en EtOH/H₂O 1:9, 0,1 M KCl a la misma velocidad de barrido, aplicando dos ciclos de voltamperometría cíclica entre 0 y -1,4 V vs Ag/AgCl.

El voltamperograma obtenido en la Figura 5.1.12 A, presenta una corriente capacitiva mucho mayor que la obtenida para un electrodo típico de LDG (Figura 5.1.1) y una resolución de las ondas electroquímicas menor. Se observa el pico de reducción de la sal de diazonio a 0,38 V vs NHE, que desaparece en el segundo ciclo.

La reducción de los grupos nitro a amino en la superficie del electrodo se realizó de la misma manera que para los electrodos LDG. Se observa la reducción de los grupos nitro a amino en el primer ciclo y en el segundo ciclo la formación de las hidroxilaminas (Figura 5.1.12 B), de manera similar a como sucede en los electrodos LDG y se ha discutido en el apartado 5.1.1.1.

Inmovilización de lacasa *Th* sobre electrodos 3D-CNT/CMF-NH₂ mediante la formación de enlace amida:

Los grupos amino de la monocapa se hicieron reaccionar con los ácidos carboxílicos de la lacasa formando enlaces amida como en el caso de los electrodos LDG descrito en el apartado 5.1.1.2. La Figura 5.1.13 muestra los resultados de los voltamperogramas medidos en presencia de aire (A) y con saturación de O₂ (B).

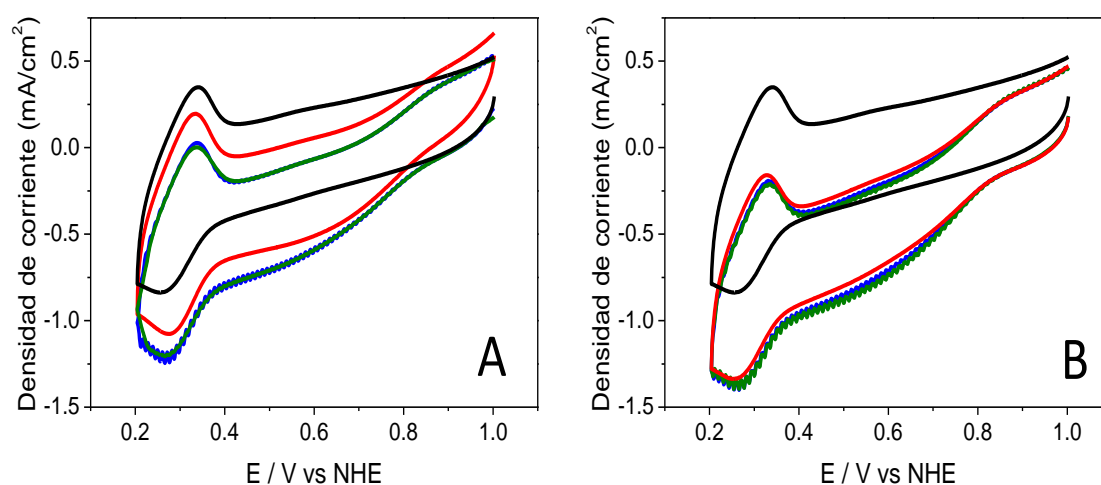


Figura 5.1.13. Voltamperogramas cíclicos de un electrodo de grafito 3D-CNT/CMF modificados con lacasa mediante la formación de enlace amida. A) Medidas realizadas al aire. B) Medidas realizadas bajo O₂. El ciclo de color negro se realizó en condiciones anaerobias, el ciclo de color rojo a una velocidad de rotación de 0 rpm, color azul a 500 rpm y color verde a 1500 rpm. La velocidad de barrido empleada fue 10 mV/s. Las medidas se realizaron en tampón acetato 50 mM, NaClO₄ 100 mM, pH 4,2, 27 °C.

Las señales observadas a 0,3 V vs NHE corresponden al equilibrio redox ArNHOH/ArNO de los grupos de la monocapa no reducidos completamente a aminos durante el tratamiento electroquímico en EtOH/H₂O (Brooksby, P. A. y col., 2004). Este proceso redox no está involucrado en la reducción bioelectrocatalítica de O₂, ya que también se observa en el voltamperograma realizado en condiciones anaerobias (ciclo de color negro, Figura 5.1.13) y en los electrodos no modificados con lacasa (Figura 5.1.12 B).

Estos electrodos presentan una alta corriente capacitiva, debida a su gran área electroactiva, así como la ya mencionada señal redox no catalítica de

las hidroxilaminas. Para un análisis más claro de las medidas se sustrajo el blanco realizado en condiciones anaerobias a los voltamperogramas realizados a 500 y 1500 rpm (Figura 5.1.14).

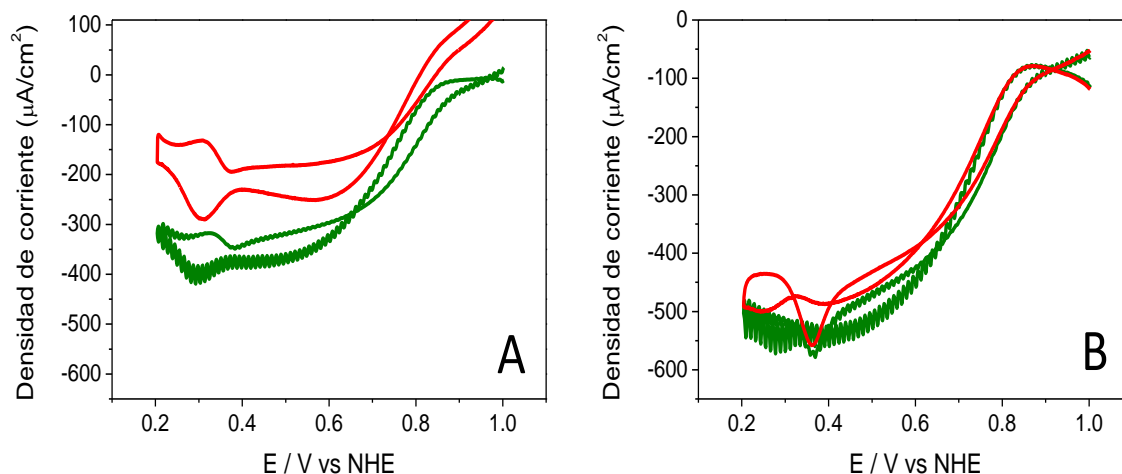


Figura 5.1.14. Voltamperogramas cíclicos de electrodos de grafito 3D-CNT/CMF modificados con lacasa mediante la formación de enlaces amida tras la sustracción del blanco realizado en condiciones anaerobias. A) Medidas realizadas al aire. B) Medidas realizadas bajo O_2 . EL ciclo de color rojo corresponde a una velocidad de 500 rpm y el color verde a 1500 rpm.

Los voltamperogramas resultantes no son tan claros debido a que la señal redox de las hidroxilaminas no es estable en el tiempo. La señal del par redox que aparece a 300 mV vs NHE va disminuyendo con el tiempo, probablemente a causa de su reducción irreversible a grupos amino (Vaz-Domínguez, C., 2009) En cuanto a la señal catalítica de reducción de O_2 , los voltamperogramas realizados muestran un plató de corriente a aproximadamente 0,4 V vs. NHE, indicando que por debajo de dicho potencial el proceso electrocatalítico no está limitado cinéticamente por la TED enzima-electrodo. La densidad de corriente catalítica obtenida al inmovilizar la lacasa a través de enlaces amida fue de $-500 \mu A/cm^2$ a 0,4 V vs NHE.

En presencia del mediador redox ABTS la densidad de corriente aumentó un 70 %, indicándonos que no todas las moléculas de lacasa se orientaron favorablemente para obtener TED, tal y como ocurrió con los electrodos LDG (apartado 5.1.1.2).

Inmovilización de lacasa *Th* sobre electrodos 3D-CNT/CMF-NH₂ mediante bases de Schiff:

Se inmovilizó lacasa sobre electrodos 3D-CNT/CMF-NH₂ mediante la formación de enlaces iminas entre los grupos oxidados con NaIO₄ de sus azúcares, los cuales se encuentran próximos al centro T1 de cobre, y los grupos amino generados sobre la superficie del electrodo, de manera similar al procedimiento descrito en el apartado 5.1.1.2 para electrodos LDG.

Como en los casos anteriores se estudió por voltamperometría cíclica la reducción bioelectrocatalítica de O₂ (Figura 5.1.15).

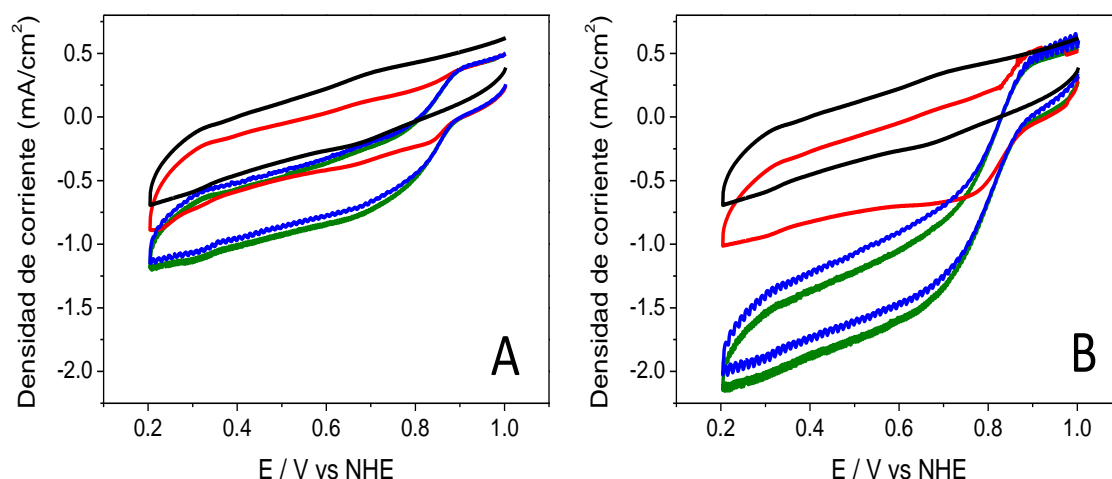


Figura 5.1.15. Voltamperogramas cíclicos de electrodos de grafito 3D-CNT/CMF modificados con lacasa mediante la formación de enlaces imina. A) Medidas realizadas al aire. B) Medidas realizadas bajo O₂. El ciclo de color negro se realizó en condiciones anaerobias y el ciclo de color rojo corresponde a una velocidad de rotación de 0 rpm, color azul 500 rpm y color verde 1500 rpm. La velocidad de barrido empleada fue 10 mV/s. Las medidas se realizaron en tampón acetato 50 mM, NaClO₄ 100 mM, pH 4,2, 27 °C.

En el voltamperograma de color rojo, realizado en condiciones estacionarias, existe una limitación difusional causada por el consumo de O₂ dentro de la estructura tridimensional del electrodo, que desaparece al rotar el electrodo, obteniéndose densidades de corriente mayores.

Al sustraer el blanco realizado en condiciones anaerobias se observa que, en presencia de aire y en condiciones saturadas de O₂, la reducción bioelectrocatalítica de O₂ empieza a 0,88 V vs. NHE y se alcanza un plató

aproximadamente a 0,7 V vs NHE (Figura 5.1.16). Esta respuesta electrocatalítica ocurre a potenciales más altos que en el caso de lacasa *Th* inmovilizada mediante la formación de enlace amida, indicándonos que la inmovilización por bases de Schiff produce una menor limitación cinética para la TED, constatando así una orientación de la lacasa más adecuada cuando se inmoviliza a través de enlaces imina. Esto se confirmó al añadir mediador redox, ABTS 0,2 mM, y comprobar que la corriente catalítica no sufrió ningún cambio.

Las medidas realizadas bajo saturación de O_2 provocan un aumento de la intensidad de corriente de casi tres veces, lo cual sugiere un aumento de la K_M aparente de la lacasa inmovilizada en estos electrodos nanoestructurados mayor que el ya constatado en el caso de los electrodos LDG (Figura 5.1.3). La unión de lacasa *Th* a electrodos 3D-CNT/CMF-NH₂ a través de enlaces tipo imina proporciona densidades de corriente catalíticas de reducción de O_2 de -1,5 mA/cm² medida a 0,4 V vs NHE cuando el electrodo rota a 1500 rpm y el tampón se encuentra saturado con O_2 . Estas corrientes son unas 3 veces más altas que en el caso de enlaces amida (Figura 5.1.14).

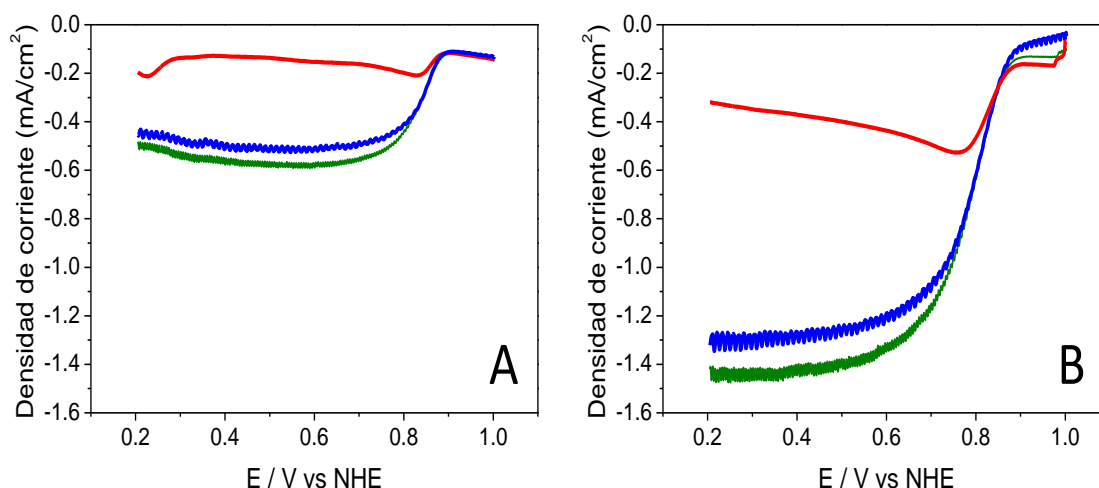


Figura 5.1.16. Voltamperogramas cíclicos de electrodos de grafito 3D-CNT/CMF modificados con lacasa mediante la formación de bases de Schiff tras sustraer el blanco realizado en condiciones anaerobias. A) Medidas realizadas al aire. B) Medidas realizadas bajo O_2 . El ciclo de color rojo corresponde a una velocidad de rotación de 0 rpm, el color azul a 500 rpm y el color verde a 1500 rpm.

Las densidades de corriente obtenidas empleando los electrodos 3D-CMF/CNT son sustancialmente más altas que las obtenidas con los electrodos LDG, llegando a duplicarse la corriente catalítica obtenida aplicando el mismo tipo de inmovilización. Mediante la inmovilización realizada por bases de Schiff, los electrodos LDG alcanzaron densidades de corriente de $-880 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, mientras que los electrodos nanoestructurados alcanzaron $-1,5 \text{ mA}/\text{cm}^2$. Al realizar la inmovilización mediante enlace amida, los electrodos LDG proporcionaron densidades de corriente de hasta $-370 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, mientras que los electrodos nanoestructurados llegaron a $-500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Estos valores de densidad de corriente se han medido a $0,4 \text{ V}$ vs NHE, aplicando una rotación de 1500 rpm y en condiciones de saturación de O_2 . Este aumento significativo en las corrientes es debido al aumento de la superficie electroactiva que presentan los electrodos nanoestructurados, permitiendo un mayor recubrimiento de lacasa por área geométrica del electrodo. Además, con los electrodos nanoestructurados y la lacasa inmovilizada por bases de Schiff se consigue una corriente catalítica que alcanza un plató a $0,6 \text{ V}$ vs NHE, algo que no se observó con los electrodo de LDG modificados análogamente. Esto confirma que los nanotubos de carbono multipared son excelentes soportes para favorecer la TED de la lacasa *Th*.

Estabilidad operacional:

La estabilidad operacional de un electrodo de grafito 3D-CNT/CMF modificado con lacasa *Th* mediante la formación de enlaces amida se estudió por cronoamperometría, aplicando un potencial de $0,4 \text{ V}$ vs NHE (Figura 5.1.18). Una primera observación al realizar el experimento fue que la rotación del electrodo durante tiempos prolongados provocaba el desprendimiento paulatino de los nanotubos, pasando a formar parte de la disolución. Este inconveniente podría estar causado por heterogeneidades durante el procesado y crecimiento de los electrodos nanoestructurados, causando una unión pobre de las microfibras de carbono a la base de grafito. En la Figura 5.1.17 se muestra el aspecto que presenta un electrodo LDG 3D-CNT/CMF.



Figura 5.1.17. Imagen de un electrodo LDG modificado con nanotubos de carbono, 3D-CNT/CMF.

Para evitar la pérdida de los nanotubos causada por la fuerza centrífuga del electrodo rotatorio se sustituyó la rotación por un agitador magnético a 500 rpm, minimizando así la desestructuración del electrodo de trabajo.

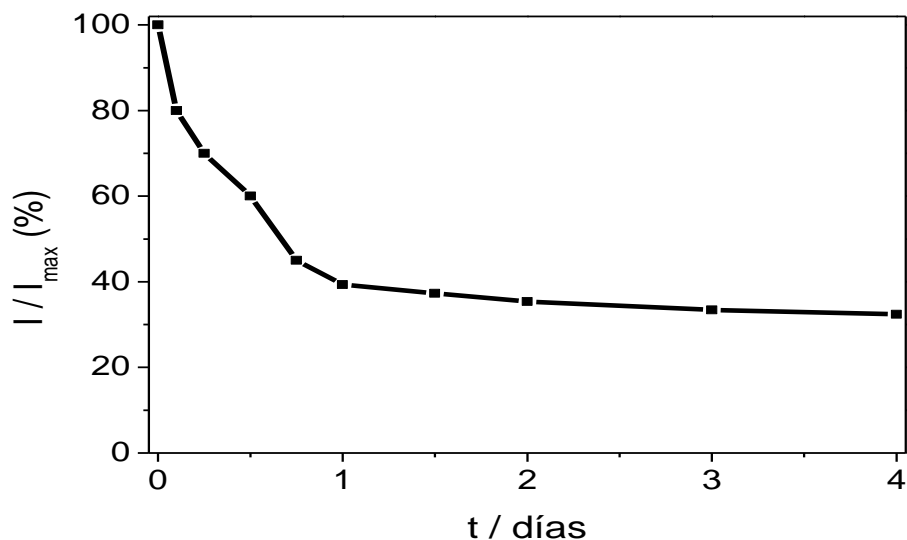


Figura 5.1.18. Estabilidad de la lacasa *Th* inmovilizada en un electrodo de grafito 3D-CNT/CMF mediante la formación de enlaces amida. Las medidas se realizaron mediante cronoamperometría a 0,4 V vs NHE, agitación magnética a 500 rpm, bajo O₂. El tampón de medida fue acetato 50 mM, NaClO₄ 100 mM, pH 4,2, 27 °C.

La estabilidad del electrodo se comprobó midiendo en continuo durante 96 horas, período tras el cual se mantiene un 30 % de la corriente catalítica inicial. Este resultado indica una estabilidad operacional similar a la

que se obtuvo para la misma modificación de electrodos LDG tras el mismo período operacional.

Dada la escasa estabilidad de los nanotubos observada en los electrodos 3D-CNT/CMF, no se procedió a estudiar la inmovilización de la lacasa a través de dos etapas como en el caso del electrodo LDG, cuya finalidad es incrementar la estabilidad operacional de la lacasa unida únicamente a través de bases de Schiff.

Inhibición por haluros:

Se estudió la inhibición producida por la presencia de NaCl y NaF en los electrodos 3D-CMF/CNT modificados con lacasa mediante (a) la formación de enlace amida y (b) bases de Schiff (Figura 5.1.19). La adición de cantidades crecientes de NaCl reduce paulatinamente la intensidad de corriente en ambos casos. Para la concentración de NaCl 140 mM, la lacasa inmovilizada por bases de Schiff mantiene el 87,1% de su actividad, mientras que la inmovilizada por enlace amida mantiene el 81%. La adición de NaF 30 mM lleva a la pérdida total de actividad por parte de la enzima.

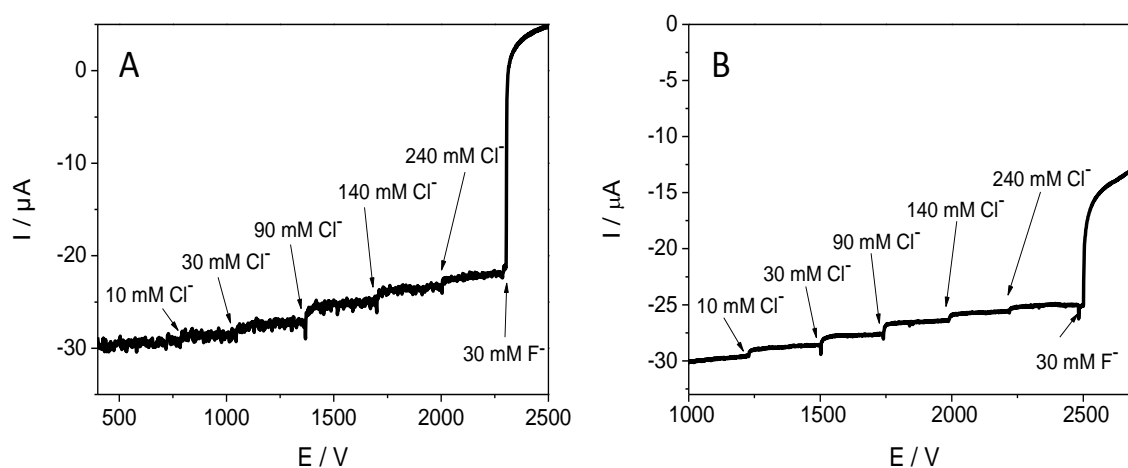


Figura 5.1.19. Cronoamperometrías realizada a electrodos 3D-CMF/CNT modificado con lacasa mediante la formación de enlaces amida (A) y mediante bases de Schiff (B). Las medidas se realizaron en tampón acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM, pH 4,2, 27 °C, bajo O_2 , rotando magnéticamente la disolución a 500 rpm, a 0,4 V vs NHE. Se añadieron durante el experimento, diferentes alícuotas de una disolución de NaCl 1 M.

Biosensor de oxígeno:

Se estudió la sensibilidad del electrodo de grafito 3D-CNT/CMF modificado con lacasa mediante la formación de enlaces imina respecto al O_2 . Para ello se midió la respuesta cronoamperométrica del electrodo siguiendo el mismo procedimiento desarrollado para los electrodos LDG e indicado en el apartado 5.1.1.5. Dado que las medidas se realizaron en el interior de la cámara anaerobia y ésta no dispone de placas de agitación magnética, en estos experimentos se aplicó la rotación del electrodo.

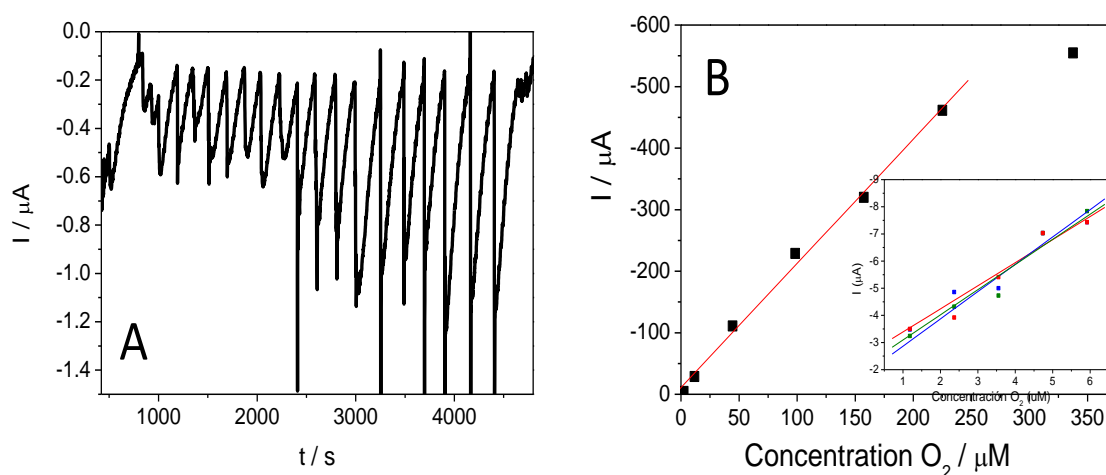


Figura 5.1.20. A) corresponde al cronoamperograma realizado a 0,4 V vs NHE, velocidad de rotación del electrodo 500 rpm, en tampón acetato sódico 50 mM, $NaClO_4$ 100 mM, pH 4,2, 27 °C, bajo N_2 y dentro de la cámara anaerobia. Las adiciones de tampón saturado con O_2 se realizaron por triplicado desde 10 μl hasta 3 ml. B) Las gráficas corresponden a la respuesta electroquímica que presenta el electrodo frente a diferentes concentraciones de O_2 .

La Figura 5.1.20 B muestra la respuesta lineal que presenta el electrodo a bajas concentraciones de O_2 . Se determinó un límite de detección de $(0,7 \pm 0,2) \mu M$ y una sensibilidad de $(8,8 \times 10^{-7} \pm 0,6) A/cm^2 M$ para el O_2 . El intervalo de linealidad del biosensor de O_2 , cubrió el intervalo desde el límite de detección hasta 225 μM . Tanto la sensibilidad como la linealidad del biosensor de O_2 nanoestructurado 3D-CNT/CMF son similares a las obtenidas con los electrodos LDG. La convergencia de estos valores pese a tratarse de superficies tan dispares se puede atribuir a que las mayores densidades de

corriente catalíticas obtenidas con los electrodos 3D-CNT/CMF compensan su mayor corriente de fondo, causada por su mayor área electroactiva.

5.1.3. Conclusiones

Se ha desarrollado una estrategia de inmovilización en dos etapas de la lacasa *Th* sobre electrodos de grafito de baja densidad que permite TED entre ambos elementos. La primera etapa persigue una orientación tal que la enzima quede con el centro de Cu T1 orientado hacia el electrodo, y la segunda etapa busca formar un enlace covalente que aporte estabilidad a la lacasa previamente orientada sobre el electrodo y así aumentar la durabilidad del bioelectrodo. La comparación de los resultados obtenidos con los de una sola etapa han confirmado la validez de la estrategia.

Mediante esta estrategia de inmovilización se han obtenido altas densidades de corriente para la reducción bioelectrocatalítica de O_2 , $-1,1 \text{ mA/cm}^2$ a $0,4 \text{ V}$ vs NHE. Además se han mejorado las prestaciones a altos potenciales, obteniendo $-275 \text{ } \mu\text{A/cm}^2$ a $0,8 \text{ V}$ vs NHE, incrementando el interés para aplicar este electrodo de lacasa como cátodo para una biopila de combustible enzimática. Estos resultados mejoran los obtenidos por Sosna y cols. al modificar electrodos de carbono con antraceno o antraquinona y adsorber posteriormente lacasa sobre los electrodos, que midieron $-12 \text{ } \mu\text{A/cm}^2$ a $0,6 \text{ V}$ vs NHE (Sosna, M. y cols., 2010).

Una vez optimizada la estrategia de modificación de superficies electroactivas de carbono para la inmovilización de la lacasa *Th*, se aplicó sobre electrodos nanoestructurados con nanofibras y nanotubos de carbono. El resultado obtenido fue mucho mayor que en el caso del LDG, ya que la densidad de corriente máxima medida a $0,4 \text{ V}$ vs NHE fue $-1,5 \text{ mA/cm}^2$, rotando el electrodo a 1500 rpm y a saturación de O_2 . Se han obtenido altas densidades de corriente bioelectrocatalítica, si se comparan los resultados con los de otros autores que inmovilizan covalentemente lacasa sobre CNT. Ramasamy y cols. prepararon nanotubos de carbono (MWCNT) modificados con ácido 1-pirenobutanoico para facilitar la TED con lacasa, midiendo densidades de corriente de reducción de O_2 de $-300 \text{ } \mu\text{A/cm}^2$ (Ramasamy, R.

P.y col., 2010). Un cátodo similar desarrolló Pang y cols. basado en nanotubos de carbono modificados con aminopireno y lacasa, obteniendo $-210 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Pang, H. L.y col., 2010).

Sin embargo, el mejor resultado reportado corresponde al encapsulado de lacasa *in situ* sobre nanotubos de carbono midiéndose densidades de corriente hasta aproximadamente $-4 \text{ mA}/\text{cm}^2$, (Miyake, T.y col., 2011).

El empleo de electrodos nanoestructurados permite inmovilizar una cantidad de enzima considerablemente mayor en la superficie de un electrodo con idéntico área geométrica, permitiendo aumentar las densidades de corriente biocatalíticas de reducción de O_2 .

Para ambos tipos de electrodos empleados (LDG y 3D-CNT/CMF) se ha conseguido mejorar considerablemente las densidades de corriente mediante TED sin el empleo de mediadores redox, los cuales reducirían el potencial efectivo de reducción de O_2 y consecuentemente el voltaje que se puede obtener en una hipotética biopila de combustible.

5.2. Electrodos de oro modificados con lacasa

En este capítulo se van a presentar y discutir los resultados obtenidos para la inmovilización y orientación de la lacasa *Th* sobre electrodos de oro funcionalizados. Se ha investigado cómo inmovilizar la lacasa *Th* mediante la formación de bases de Schiff y cómo aumentar la estabilidad de dicha unión mediante una estrategia de inmovilización en dos etapas, análoga a la realizada sobre los electrodos LDG (capítulo 5.1.1.2). Para optimizar la TED se ha desarrollado la formación de una monocapa mixta mediante la reducción de sales de diazonio sobre oro y posterior quimisorción de una monocapa autoensamblada (SAM) de tioles.

La estrategia se ha desarrollado y caracterizado primero sobre electrodos de oro planos, y posteriormente sobre electrodos de oro mesoporosos con la intención de aumentar la densidad de lacasa inmovilizada, y así aumentar las corrientes catalíticas de reducción de O_2 por TED.

5.2.1. Caracterización de electrodos planos de oro

Los electrodos empleados fueron discos planos de oro de 0,5 cm de diámetro con un área geométrica de 0,196 cm². El valor medio del área electroactiva, medida como se describe en el apartado 3.2.6.2.1, resultó ser 0,4 ± 0,1 cm². Este dato corresponde a un factor de rugosidad del electrodo de 2,4. Para el cálculo de densidades de corriente catalíticas se consideró el área geométrica del electrodo. Antes de su modificación, los electrodos se sometieron a un pretratamiento como se indica en el apartado 3.2.5.1.1.

5.2.2. Funcionalización de los electrodos planos de oro

Se estudió la formación de monocapas sobre la superficie de oro mediante la reducción de sales de diazonio aromáticas, con el fin de generar grupos amino en la superficie del electrodo para poder anclar la enzima covalentemente. Está descrito en la literatura que por este método se puede recubrir la superficie del metal con monocapas, o incluso multicapas, de compuestos aromáticos mediante la formación de un enlace covalente C-Au

(Laurentius, L.y col., 2011). Estas películas orgánicas tienen mayor estabilidad mecánica y térmica que las conseguidas mediante formación de SAM de tioles, las cuales se basan en un enlace S-Au (Lyskawa, J.y col., 2006).

La modificación de la superficie del oro se llevó a cabo electroquímicamente, introduciendo el electrodo en una celda electroquímica que contenía sal de diazonio 4-nitrofenilo 1 mM. La aplicación de dos ciclos de voltamperometría cíclica entre 0,6 y -0,6 V vs Ag/AgCl a 200 mV/s produjo la modificación, tal y como muestra en la Figura 5.2.1 (Harper, J. C.y col., 2009) (Lyskawa, J.y col., 2006) (Kullapere, M.y col., 2010).

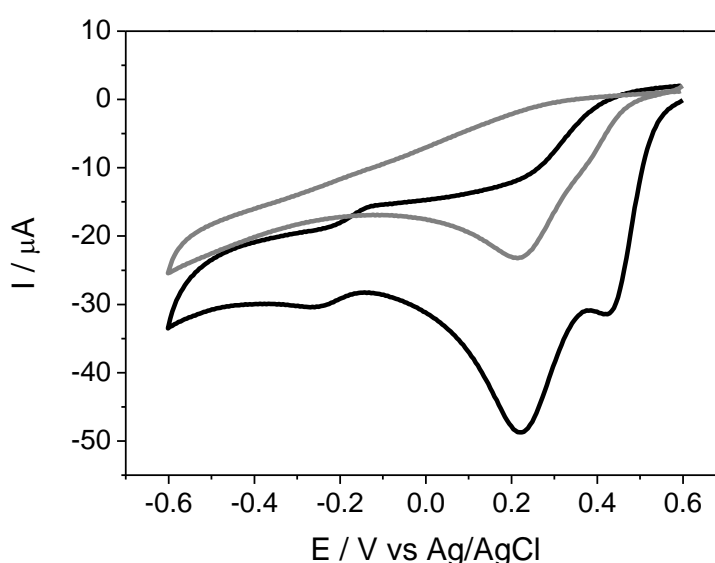


Figura 5.2.1. Modificación de un electrodo de oro por reducción de sal de diazonio de 4-nitrofenilo 1mM en acetonitrilo, conteniendo BF_4ClO_4 100 mM. Se realizaron dos ciclos de voltamperometría cíclica entre 0,6 y -0,6 V a 0,2 V/s. El primer ciclo se representa en color negro y el segundo ciclo en gris.

Se puede observar como aparece un pico pronunciado a 0,2 V vs Ag/AgCl, como ocurre con los electrodos de carbono, correspondiente a la reducción de la sal de diazonio sobre el electrodo de oro. También se aprecian, sobre todo en el primer ciclo, otras dos ondas de reducción menos intensas, a potenciales más positivos y a potenciales más negativos respecto de la señal intensa. Esta multiplicidad de señales redox se debe a la diferente reactividad que ofrecen los diferentes planos cristalográficos del oro (Benedetto, A.y col., 2008).

Posteriormente, los grupos nitro generados en la superficie del electrodo se redujeron electroquímicamente. En el primer ciclo (Figura 5.2.2, negro) de voltamperometría cíclica se observa la reducción irreversible de los grupos nitro a amino, y como aparece en el barrido de vuelta la onda de oxidación de las hidroxilaminas generadas durante el barrido de ida. En el segundo ciclo (color gris) aparece el proceso redox reversible de las hidroxilaminas.

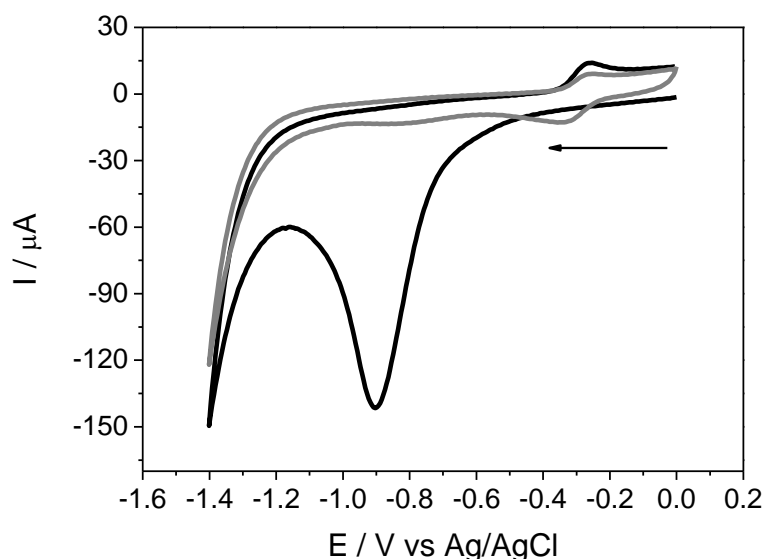


Figura 5.2.2. Reducción electroquímica de los grupos 4-nitrofenilos de la superficie del electrodo de oro. Las medidas se realizaron en EtOH/H₂O 1:9, 0,1 M KCl a una velocidad de barrido de 0,2 V/s, aplicando dos ciclos de voltamperometría cíclica entre 0 y -1,4 V vs Ag/AgCl. Se muestra con una flecha el sentido del barrido.

Para comprobar si la monocapa creada sobre el electrodo de oro es eficaz para unir covalentemente lacasa y obtener TED, se depositó una disolución de lacasa *Th* tratada con NaIO₄ para formar bases de Schiff entre sus grupos glicosilados oxidados y los grupos amino del electrodo modificado. En la Figura 5.2.3 se muestran los voltamperogramas medidos después de la inmovilización de la lacasa. En el primer ciclo se aprecia una señal redox irreversible muy intensa, aproximadamente a 0,8 V vs NHE, que podría corresponder a la reducción del centro de cobre T1 de la lacasa (Reinhammar, B. R. M., 1972) (Xu, F.y col., 1996a). En el segundo ciclo, realizado a saturación de O₂ (Figura 5.2.3 verde), se observa un proceso electrocatalítico de reducción de O₂ que comienza al potencial del centro T1 de la lacasa, tal

como se aprecia si se compara con el experimento control realizado en ausencia de enzima, pero de muy escasa magnitud. Al añadir el mediador redox ABTS (Figura 5.2.3 azul) la corriente catalítica medida bajo O_2 aumenta considerablemente debido a la transferencia electrónica mediada, lo que sugiere que hay lacasa activa inmovilizada sobre el electrodo pero sin la orientación adecuada para un proceso de TED. Sin embargo, el primer voltamperograma registrado nos sugiere que gran parte de la enzima inmovilizada se ha inactivado irreversiblemente.

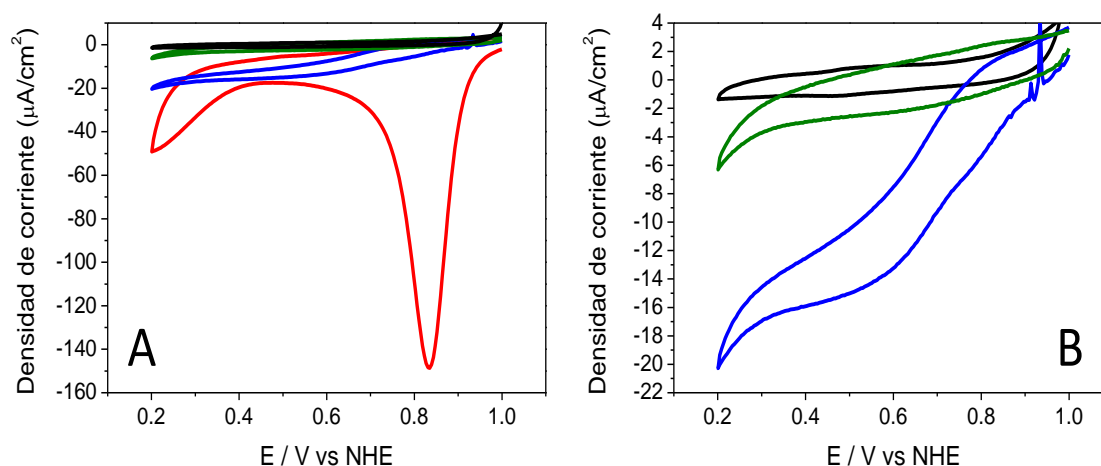


Figura 5.2.3. Electrodo de oro modificado por reducción de la sal de diazonio 4-nitrofenilo y posterior inmovilización de lacasa mediante bases de Schiff. Voltamperogramas consecutivos en tampón acetato 50 mM, $NaClO_4$ 100 mM, pH 4,2 y 27 °C. La velocidad de barrido fue 10 mV/s. El ciclo de color negro corresponde al electrodo control sin lacasa, el ciclo de color rojo a la primera medida realizada al aire, el ciclo de color verde corresponde a la segunda medida realizada bajo O_2 y el ciclo de color azul cuando se añade 0,2 mM ABTS. La gráfica B es una ampliación de la gráfica A.

La integración de la onda de reducción electroquímica permite calcular la cantidad de grupos amino que han reaccionado con el electrodo (Figura 5.2.2), obteniéndose un recubrimiento de $5,5 \times 10^{-10}$ mol/cm². Teniendo en cuenta que el recubrimiento teórico de una monocapa completa de 4-aminofenilo es $12,5 \times 10^{-10}$ mol/cm² (Allongue, P.y col., 1997), podemos deducir que la modificación electroquímica no está formando una monocapa completa, sino que se está modificando el 45 % de la superficie de oro. Esto explicaría el comportamiento observado en los voltamperogramas de la Figura 5.2.3 A, ya

que al existir zonas de oro desnudas, la lacasa se podría haber adsorbido físicamente y desnaturalizarse sobre el oro. La onda intensa de reducción irreversible es atribuible al centro de cobre T1 de la lacasa desnaturalizada (Shleev, S.y col., 2005b).

Para superar este inconveniente se tomaron dos medidas: (a) Se trató de aumentar el recubrimiento de anillos aromáticos en la superficie del electrodo, incrementando la concentración de la sal de diazonio a 2 mM. Para minimizar la formación de multicapas por parte de los derivados de diazonio se aplicó un único ciclo en lugar de dos. (b) Se procedió a recubrir aquellas zonas del oro que quedan desnudas después de la modificación con sal de diazonio con SAM, para lo cual se incubó el electrodo en presencia de diferentes clases de tioles (Figura 5.2.4). Se utilizaron tioles cargados positivamente como cistamina y 4-ATP, cargados negativamente como el ácido mercaptopropiónico y ácido tióctico, y por último tioles polares sin carga como 2-mercaptoetanol y 6-mercapto-1-hexanol (MH).

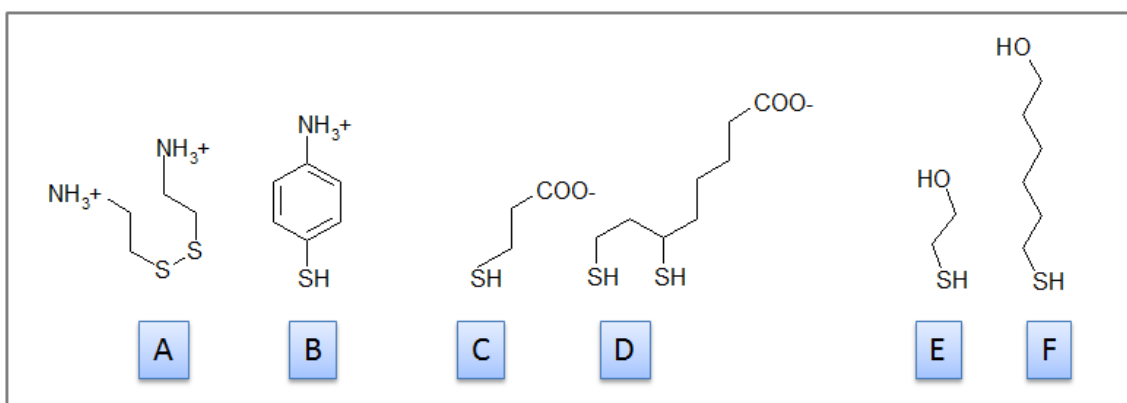


Figura 5.2.4. Representación de los diferentes tioles empleados para la funcionalización de la superficie de oro. A) Cistamina. B) 4-ATP. C) Ácido mercaptopropiónico. D) Ácido tióctico. E) 2-mercaptoetanol y F) MH.

Sobre los electrodos así modificados se procedió a depositar una disolución de lacasa *Th* tratada con NaIO_4 , para formar bases de Schiff entre sus grupos glicosilados oxidados y los grupos amino del electrodo modificado. Una vez modificados con la lacasa *Th*, se midieron los resultados de reducción electroenzimática de O_2 por voltamperometría. En la Figura 5.2.5 se muestran los resultados para los electrodos modificados con lacasa sobre monocapas

mixtas de la sal de diazonio 2 mM y las diferentes SAM de los tioles descritos en la Figura 5.2.4.

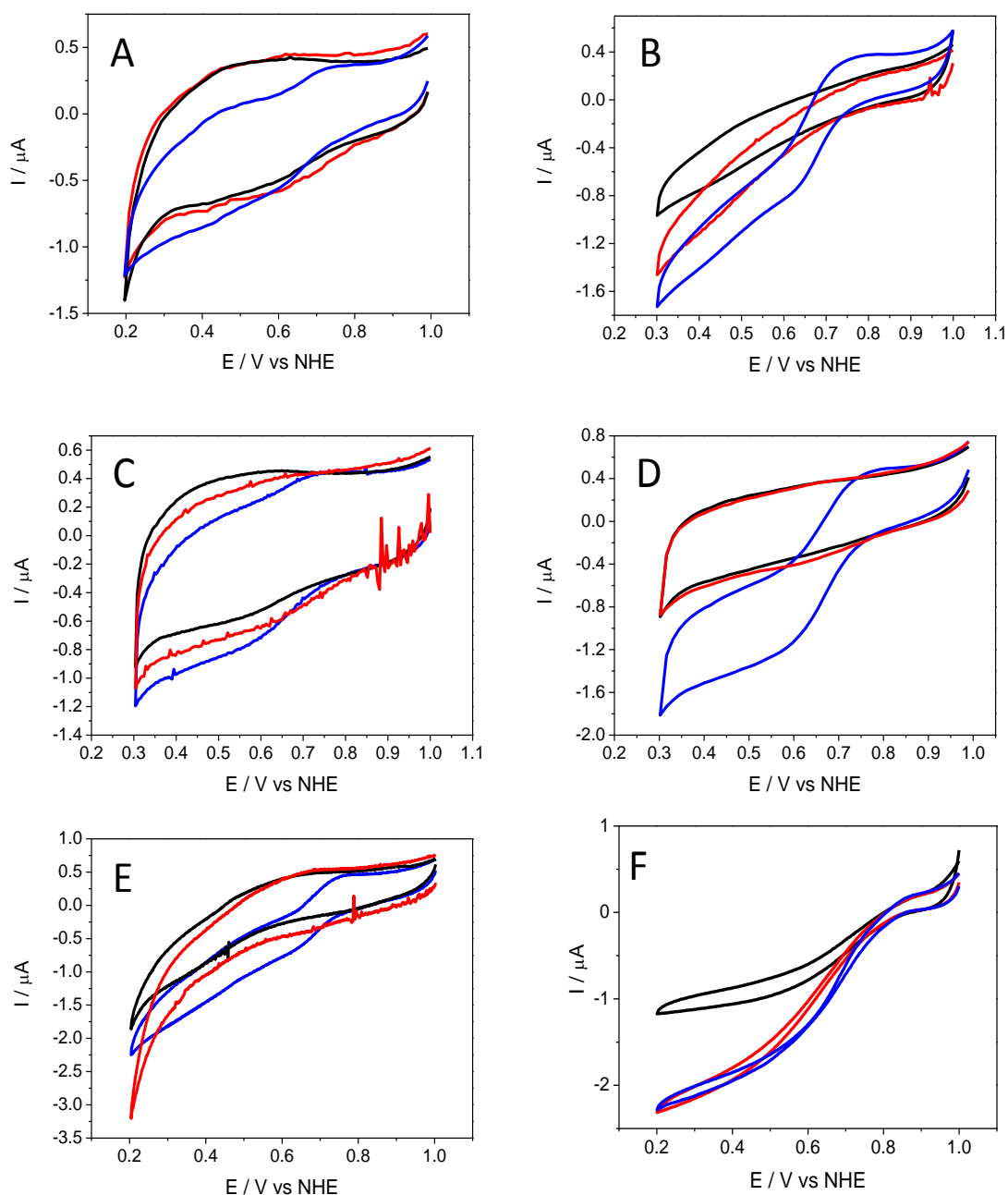
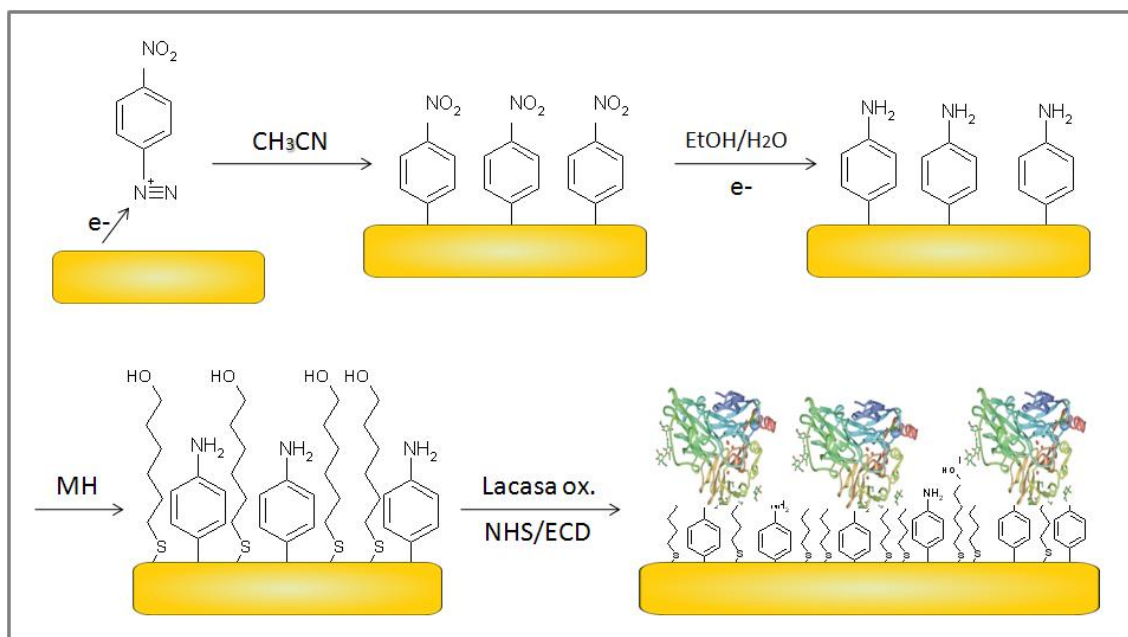


Figura 5.2.5. Voltamperometrías cíclicas de electrodos de oro modificados con sal de diazonio y diferentes tioles: A) Cistamina, B) 4-ATP, C) ácido mercaptopropiónico, D) ácido tióctico, E) 2-mercaptoetanol y F) MH. El ciclo negro corresponde a la medida realizada al aire, el rojo a cuando el tampón está saturado con O₂ y el azul a cuando se añade ABTS 0,2 mM como mediador redox. El tampón de medida fue acetato 50 mM, NaClO₄ 100 mM, pH 4,2, y la temperatura 27 °C.

La corriente de reducción de O_2 más alta en ausencia de mediador redox se consiguió con el electrodo modificado con la monocapa mixta que incluía MH. Con el resto de tioles empleados no se obtuvo apenas TED, tan sólo TM. Llama la atención que con el 2-mercaptoetanol, que presenta el mismo grupo funcional que el MH, no se obtiene TED. Esta diferencia se podría explicar por la cadena más corta del 2-mercaptoetanol, que al tener interacciones Van der Waals laterales entre los tioles mucho menores no se genere una monocapa uniforme sobre el electrodo, dificultando la orientación adecuada de la enzima para la TED.

Se puede concluir que el MH fue capaz de recubrir eficazmente aquellas regiones de la superficie que la reacción con la sal de diazonio dejó desnudas. Este recubrimiento evitó tanto la desnaturalización de la lacasa por adsorción directa sobre el oro, como la reducción electroenzimática de O_2 a través del centro T2/T3 de la lacasa, lo que habría conducido a la formación de H_2O_2 y a la reducción del potencial redox del electrodo enzimático (Shleev, S.y col., 2005b) (Pita, M.y col., 2006). Además, el empleo del tiol también contribuye a la eliminación de los residuos orgánicos adsorbidos físicamente sobre el oro desnudo durante la diazotación del electrodo (Shewchuk, D. M.y col., 2009). De este modo, la modificación selectiva de la superficie del electrodo permite (a) una orientación óptima de la enzima, y (b) minimiza la distancia entre el centro activo de la misma y la superficie del electrodo; favoreciendo la TED entre el electrodo de oro y la lacasa (Léger, C.y col., 2008).

Las etapas de modificación de los electrodos de Au con la monocapa mixta de 4-aminofenilos/MH se detallan en el Esquema 5.2.1.



Esquema 5.2.1. Representación de la estrategia desarrollada para modificar un electrodo de oro con una monocapa mixta de 4-aminofenilo/MH y posterior unión covalente de lacasa.

5.2.2.1. Caracterización de la monocapa mixta de 4-aminofenilos/6-mercaptohexanol

Las superficies de oro modificadas con SAM de tioles han sido ampliamente estudiadas (Love, J. C. y col., 2005). Sin embargo, durante la realización de esta tesis se ha empezado a aplicar la modificación de superficies de oro por reducción de sales de diazonio, permitiendo de esta manera generar capas orgánicas unidas covalentemente a la superficie del metal (Laurentius, L. y col., 2011). La formación de una monocapa mixta a partir de una sal de diazonio y una SAM de un tior como plataforma efectiva para la inmovilización de una enzima redox es un logro novedoso de esta tesis, que requiere una caracterización por varias técnicas distintas, como se detalla a continuación.

Desorción electroquímica del tior:

Para calcular el recubrimiento de MH sobre la superficie del electrodo de oro se procedió a la desorción electroquímica de la monocapa autoensamblada

del tiol mediante la aplicación de potenciales reductivos que rompan el enlace Au-S (Walczak, M. M. y col., 1991). Primero se comprobó que los grupos 4-aminofenilos del electrodo no sufrían desorción electroquímica en las condiciones de desorción electroquímica de SAM de tioles mediante la comparación con el voltamperograma realizado con un electrodo de oro desnudo (Figura 5.2.6 A). Este resultado está de acuerdo con que la modificación de oro a partir de sales de diazonio de lugar a monocapas más robustas que las SAM de tioles (Gooding, J. J. y col., 2003). En consecuencia, la desorción reductiva medida con un electrodo de oro funcionalizado con la monocapa mixta sólo está causada por la ruptura de enlaces Au-S, asegurándonos por tanto que el recubrimiento calculado mediante la integración del pico de desorción generado en NaOH 0,5 M corresponde solamente al MH. Se procedió a realizar las medidas de voltamperometría cíclica a varios electrodos de oro modificados con la monocapa mixta de 4-aminofenilo/MH. A partir de la integración del pico de reducción (Figura 5.2.6 B gris) en NaOH 0,5 M de varios electrodos se obtuvo un recubrimiento medio de MH de $(6,7 \pm 0,2) \times 10^{-10}$ mol/cm². También se determinó la señal de electrodos de oro recubiertos al 100 % por tiol, por tanto sin 4-aminofenilo, obteniendo un recubrimiento medio de $(9,1 \pm 0,1) \times 10^{-10}$ mol/cm² (Figura 5.2.6, B negro). El dato teórico de recubrimiento de un electrodo de oro de una monocapa compacta de un alcanotiol es de $9,3 \times 10^{-10}$ mol/cm² (Widrig, C. A. y col., 1991), por lo que el resultado experimental obtenido cuando se recubre el electrodo de oro con solo una SAM de MH es bastante similar al teórico. La diferencia entre el recubrimiento del electrodo modificado solo con SAM de MH y el recubrimiento de MH cuando el electrodo estaba modificado con una monocapa mixta de 4-aminofenilo/MH es del 27 %. Esta diferencia de recubrimientos debe corresponder al área modificada con grupos 4-aminofenilos en la monocapa mixta. Si comparamos este dato de 27 % de área del electrodo modificado con grupos 4-aminofenilo en la monocapa mixta con el dato obtenido al reducir electroquímicamente los grupos 4-nitrofenilos determinado anteriormente, y el cual correspondía al 45 % de una monocapa compacta de grupos 4-aminofenilo, se podría concluir que en algunas regiones

de la superficie del electrodo se ha formado más de una capa de grupos 4-aminofenilo.

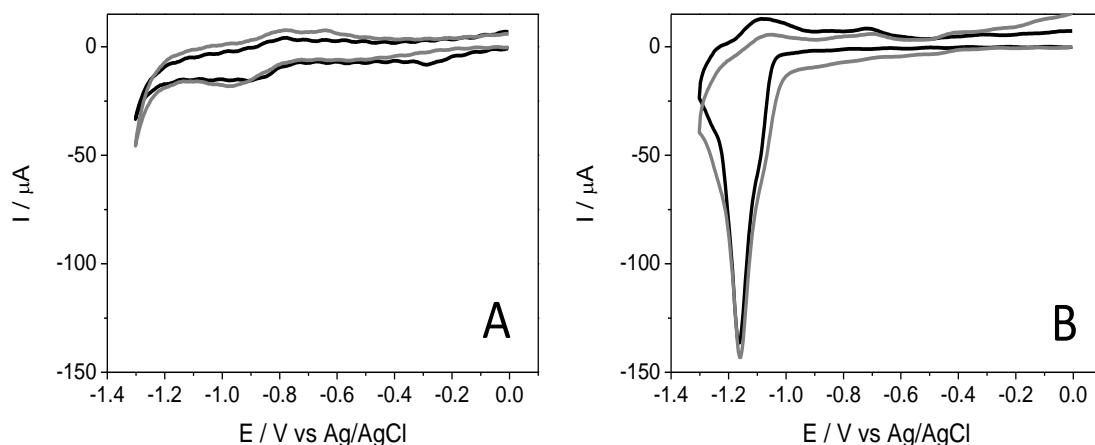


Figura 5.2.6. Desorciones reductivas realizadas en NaOH 0,5 M a 200 mV/s, bajo N_2 , de electrodos de oro modificados con diferentes monocapas: **A)** Monocapa de 4-aminofenilo (ciclo de color negro) y control con oro desnudo (ciclo de color gris). **B)** Monocapa mixta de 4-aminofenilo/MH (ciclo de color gris) y control con SAM de MH (ciclo de color negro).

Espectroscopía de Impedancia Electroquímica:

Se realizaron medidas de impedancia para caracterizar la monocapa mixta creada sobre el oro. Se compararon a través de la representación de Nyquist la respuesta de los siguientes electrodos: oro recubierto con 4-nitrofenilo, oro recubierto con 4-aminofenilo y oro recubierto con una monocapa mixta 4-aminofenilo/MH (Figura 5.2.7). La resistencia electrónica ofrecida se calculó usando circuitos electrónicos equivalentes según el modelo de Randles y Ershel (Pita, M. y col., 2002). La superficie modificada con grupos 4-nitrofenilo presentó una gran resistencia, 55 k Ω , debido a que la superficie se encuentra polarizada negativamente a pH 4 y repele a la sonda redox de $[Fe(CN)_6]^{4-}$, que se encuentra cargada negativamente. El electrodo modificado con 4-aminofenilos mostró un valor de resistencia eléctrica mucho menor que el anterior, ya que los grupos amino se protonan a pH 4 dando lugar a una carga positiva del electrodo, adquiriendo un valor de 5,4 k Ω . El electrodo modificado con una monocapa mixta ofreció una resistencia de 9 k Ω . En este caso la presencia de la SAM duplica el valor de la resistencia, esto es debido a que el MH recubre las zonas del oro no modificadas por 4-aminofenilos, además de

eliminar posibles sustancias quimisorbidas, provocando un aumento en el valor de la resistencia.

La Figura 5.2.7 B muestra el control que se realizó en un electrodo modificado solamente con MH. El valor de la resistencia que presenta la SAM de MH es 8 k Ω , similar al que se obtuvo con la monocapa mixta. Al realizar la espectroscopía de impedancia sobre un electrodo de oro desnudo, solo se observa el proceso Warburg de control de transferencia de masa sobre el oro.

Los resultados obtenidos a través de la espectroscopía de impedancia confirman la presencia de los dos tipos de molécula formando una monocapa mixta sobre la superficie del electrodo.

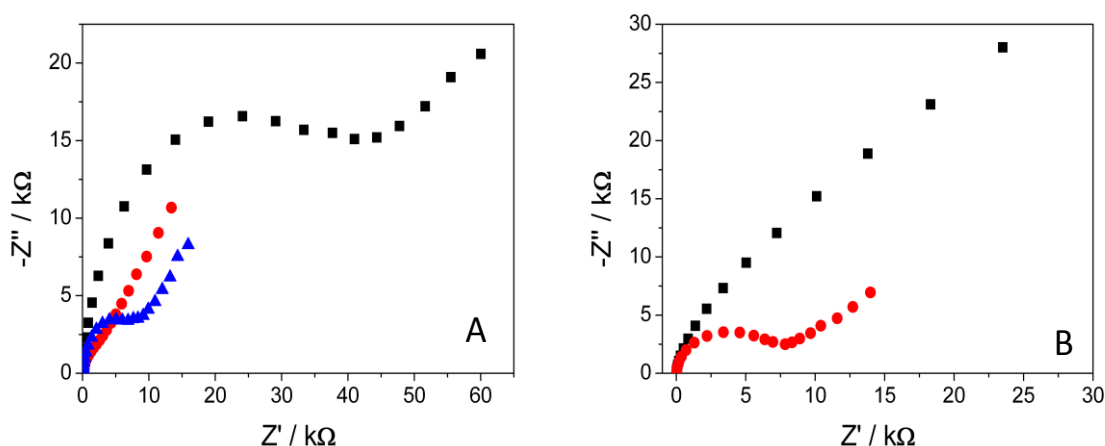


Figura 5.2.7. Medidas de impedancia realizadas en electrodos de oro modificados: **A)** a) monocapa de 4-nitrofenilo, b) monocapa de 4-aminofenilo, c) monocapa mixta 4-aminofenilo/MH. **B)** a) control de oro desnudo, b) SAM de mercaptohexanol. Las medidas se realizaron en $K_4[Fe(CN)_6]$ como sonda electroquímica en tampón acetato 50 mM, $NaClO_4$ 100 mM, pH 4,2.

Análisis de la superficie por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS):

Para estudiar la composición química en la superficie de oro modificada y demostrar la presencia de ambos compuestos de la monocapa mixta de 4-aminofenilo y MH, se realizaron medidas de XPS.

En la Figura 5.2.8 A, se observa una señal intensa en dos de los tres espectros, correspondiente a una energía de ligadura de 399,5 eV, que se asigna a la región 1s de nitrógeno. Esta señal aparece en la muestra

modificada con la monocapa mixta y en el control modificado con sólo 4-aminofenilo, mientras que en la muestra control con SAM completa de MH no aparece, es decir no existe respuesta a esta energía.

Se muestra en la Figura 5.2.8 B, la señal intensa detectada que presenta dos picos a 162 y 163,1 eV, la cual corresponde a la región 2p de azufre. El desdoblamiento de la banda se debe a dos dobletes que están asociados al desplazamiento p: $Sp_{1/2}$ y $Sp_{3/2}$. Esta señal aparece en la muestra con la monocapa mixta y en la muestra control con solo SAM de MH, mientras que no aparece en la muestra control modificada con solo 4-aminofenilo.

Por lo tanto, la muestra modificada con la monocapa mixta contiene la señal asociada a la región 1s de nitrógeno y también la señal de azufre detectada en la muestra control con 100% de SAM del tiol, confirmando la existencia de grupos 4-aminofenilo y MH en la monocapa estudiada.

La presencia de especies absorbidas sobre las muestras, como CO_2 y N_2 , distorsionan la proporción de los diferentes tipos de átomos en la monocapa, impidiendo obtener un análisis cuantitativo.

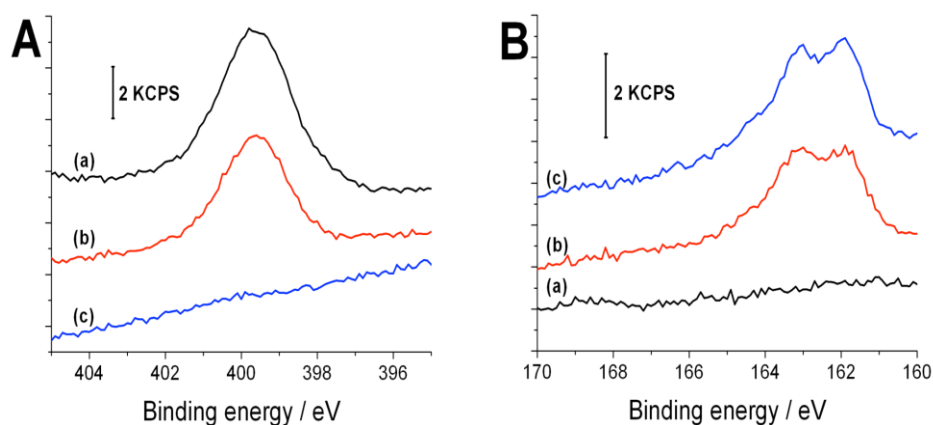


Figura 5.2.8. Espectros de XPS pertenecientes a un electrodo de oro modificado (a) con grupos 4-aminofenilo (b) con monocapa mixta 4-aminofenilo/MH y (c) SAM de MH. Los espectros A corresponden a las señales 1s de nitrógeno y los espectros B a las 2p de azufre.

5.2.3. Unión covalente de lacasa

En el Esquema 5.2.1 se muestran las etapas seguidas para modificar el electrodo de oro con la monocapa mixta 4-aminofenilo / MH descrita en el apartado 5.2.2.1 y utilizada para la inmovilización de lacasa *Th*. La unión covalente de la lacasa se realizó en dos etapas, de manera análoga a la descrita para los electrodos de LDG, descrita en el capítulo 5.1.1.2.

Caracterización por AFM:

El electrodo de oro es una superficie plana, lo que permite estudiar la inmovilización covalente de la lacasa *Th* mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). En la imagen de AFM mostrada en la Figura 5.2.9 A se muestra una parte representativa de una superficie plana de oro modificada con lacasa *Th*, en la que se puede observar como después de la inmovilización de la enzima existen zonas de Au (111) con unas dimensiones de unos pocos micrómetros. Un análisis ampliado de la zona (Figura 5.2.9, B) muestra como la superficie de oro modificada presenta un film compuesto por glóbulos y agujeros distribuidos al azar. La rugosidad de la muestra medida es de $(3,5 \pm 0,5)$ nm, que concuerda con la presencia de una monocapa con moléculas de lacasa, cuyas dimensiones son de $(65 \times 55 \times 45)$ Å³ según la estructura cristalográfica publicada (Piontek, K.y col., 2002). Como las moléculas de lacasa están próximas entre sí, las dimensiones de la punta del AFM (≈ 20 nm) no permiten discernir moléculas individuales de enzima en el plano XY y por tanto determinar el recubrimiento. La presencia de agujeros en la muestra sugiere que se ha formado una submonocapa con moléculas de lacasa más que una monocapa completa, y que la lacasa se encuentra organizada en pequeñas islas compactas.

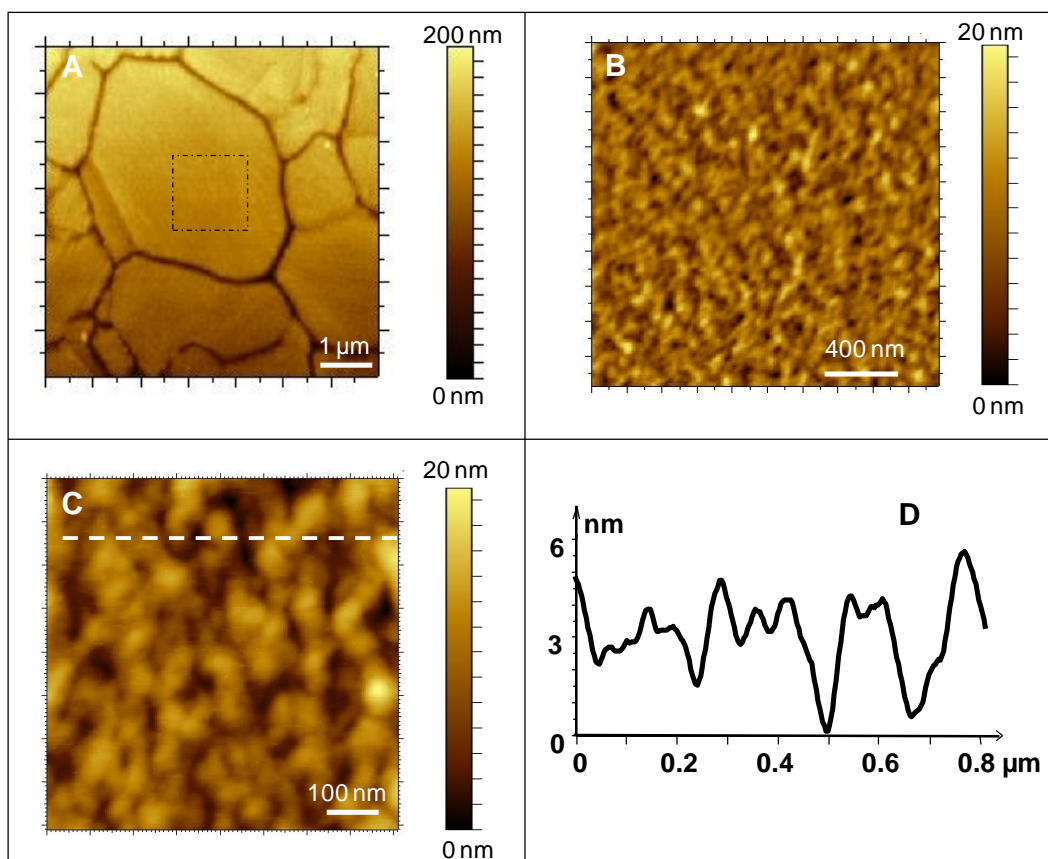


Figura 5.2.9. A) Imagen topográfica de AFM de una superficie de oro (111) modificada con lacasa. B) Ampliación del cuadrado que aparece en la imagen A. C) Imagen topográfica de otra zona de la muestra. D) Perfil topográfico de la línea que cruza la figura C.

Se realizaron experimentos control con un electrodo de oro desnudo (111), como se muestra en la imagen de la Figura 5.2.10 A, y después de modificarlo con la monocapa mixta, Figura 5.2.10 B. Se puede observar cómo el perfil topográfico está mucho más suavizado si se compara con la misma superficie modificada con lacasa (Figura 5.2.10 C). En la Figura 5.2.10 B, se aprecia como existen dos alturas diferentes en la superficie del electrodo, lo cual concuerda con la presencia de los dos compuestos diferentes en la monocapa mixta, es decir 4-aminofenilo y MH.

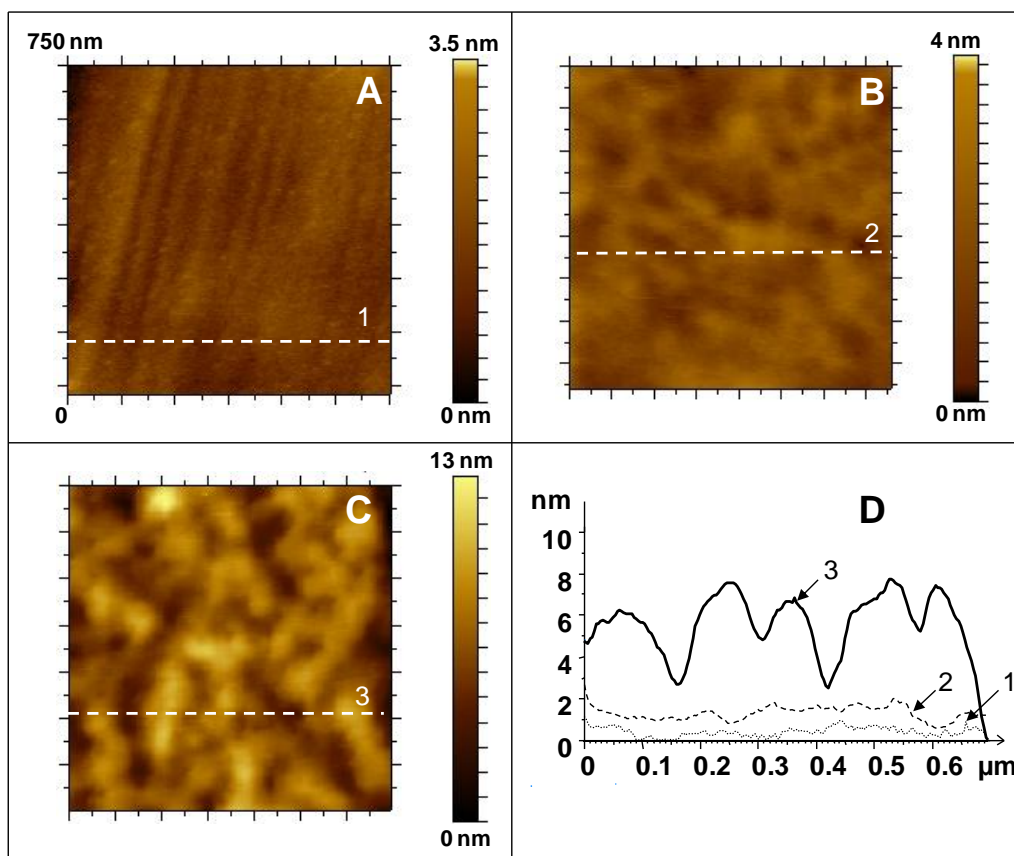


Figura 5.2.10. Imágenes topográficas de AFM de 750x750 nm: A) oro (111), B) oro (111) modificado con monocapa mixta 4-aminofenilo/MH y C) después de inmovilizar lacasa. D) Perfil topográfico correspondiente a las líneas 1, 2 y 3.

Reducción bioelectrocatalítica de oxígeno:

Se estudió la respuesta electrocatalítica del electrodo de oro modificado con lacasa mediante voltamperometría cíclica.

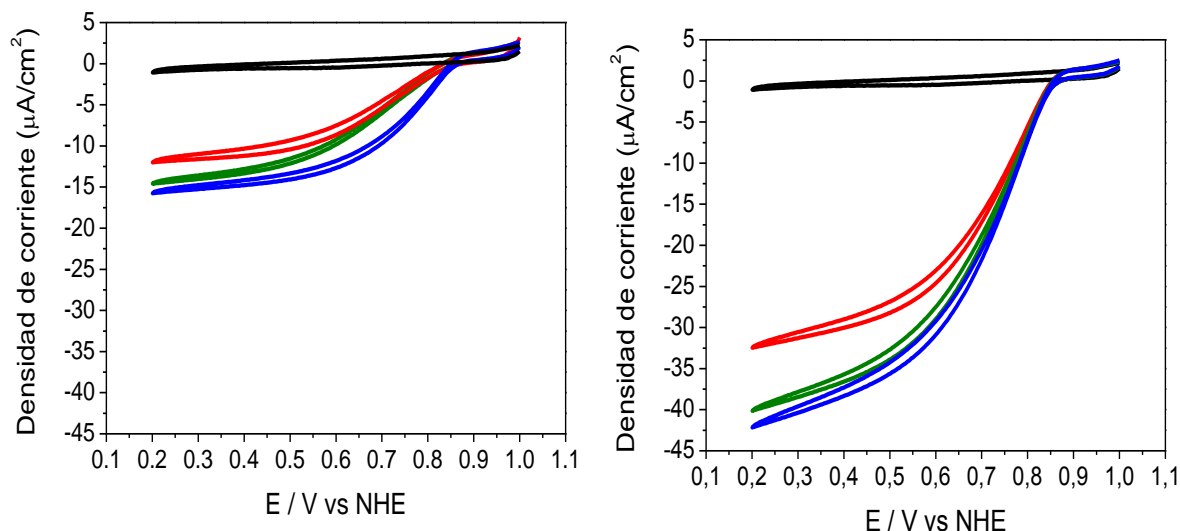


Figura 5.2.11. Reducción bioelectrocatalítica de O_2 de un electrodo de oro modificado con lacasa en dos etapas. En la gráfica de la izquierda, se muestran las voltamperometrias realizadas al aire y en la gráfica de la derecha las realizadas en tampón saturado en O_2 . El ciclo de color rojo corresponde al electrodo sin rotación, el color verde a cuando se rota el electrodo a 500 rpm y el azul a 2500 rpm. El ciclo de color negro corresponde al experimento en presencia del inhibidor NaF 30 mM. Las medidas se realizaron en tampón acetato 50 mM, $NaClO_4$ 100 mM, pH 4,2 y temperatura 27 °C.

La Figura 5.2.11 recoge diferentes voltamperogramas del electrodo de oro modificado con lacasa, donde se aprecia la reducción electrocatalítica de O_2 .

Tomando como blanco el voltamperograma medido en presencia del inhibidor F^- se determina que la onda de corriente catalítica de reducción de O_2 comienza a 0,85 V vs NHE, indicando que el efecto catalítico se debe a la lacasa inmovilizada. Al igual que sobre los electrodos de carbono, la onda catalítica corresponde con el valor del potencial redox del centro T1, es decir 0,780 V vs NHE (Reinhammar, B. R. M., 1972) (Xu, F.y col., 1996b), por lo tanto el proceso electrocatalítico involucra TED a través del centro T1 de la lacasa (Yaropolov, A. I.y col., 1994) (Solomon, E. I.y col., 1996).

El potencial medio de la reducción catalítica de O_2 medida en este trabajo es mucho mayor que el medido por otros autores empleando electrodos de oro modificados con lacasa (González Arzola, K.y col., 2010) (Ressine, A.y col., 2010). Esto ocurre porque en aquellos métodos de inmovilización reportados la orientación de la lacasa no es adecuada para la TED a través del centro T1, o se favorece una degradación de la enzima al inmovilizarse sobre el electrodo, transfiriéndose los electrones directamente al centro T2/T3 de la lacasa y produciéndose una reducción parcial de O_2 a H_2O_2 a potenciales menores (Shleev, S.y col., 2005b).

Thorum y cols. obtienen densidad de corriente de reducción de O_2 de $-25 \mu A/cm^2$ pero con lacasa adsorbida en un electrodo de oro modificado con una SAM de antraceno-2-metanotiol (Thorum, M. S.y col., 2010). Sin embargo, mediante nuestro método de inmovilización de lacasa se consigue una densidad de corriente catalítica de reducción de O_2 de $-38 \mu A/cm^2$ medida a 400 mV vs NHE cuando el electrodo rota a 1500 rpm y bajo O_2 , mejorando los resultados obtenidos por Thorum y cols. (Thorum, M. S.y col., 2010).

Al añadir ABTS como mediador redox la densidad de corriente catalítica por TM medida a 0,4 V vs NHE aumenta solo un 12 % respecto a la corriente obtenida mediante TED, como se muestra en la Figura 5.2.12, A. Un aumento del 12% es modesto, lo que indica que la mayoría de las moléculas de lacasa inmovilizadas sobre el electrodo se encuentran orientadas correctamente.

En los volamperogramas medidos en presencia de ABTS (Figura 5.2.12B) se puede observar cómo al rotar el electrodo a diferentes velocidades, desde 500 a 2500 rpm (ciclos de color gris), las corrientes catalíticas por TM apenas varían. Es decir, el proceso catalítico mediado no depende del transporte del mediador redox ni del sustrato O_2 hacia el electrodo.

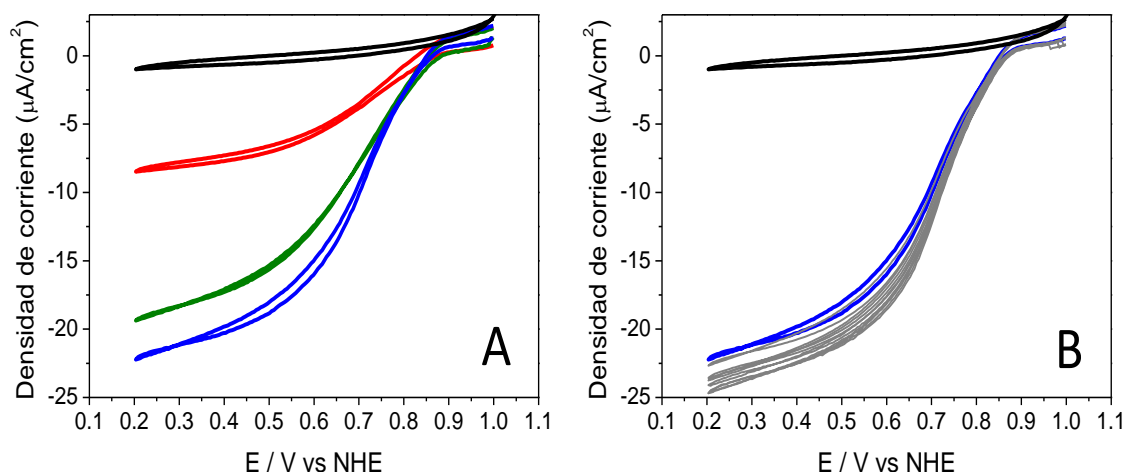


Figura 5.2.12. Efecto de la presencia de ABTS en las voltamperometrías cíclicas medidas con el electrodo de oro modificado con lacasa en dos etapas. A) El ciclo de color negro corresponde a cuando la enzima está inhibida en presencia de NaF 30 mM, el ciclo de color rojo a la medida bajo aire, el verde a la medida bajo atmósfera de O_2 y el ciclo de color azul a la medida en presencia de ABTS, todas las medidas se hicieron a 0 rpm. B) Voltamperogramas cíclicos en presencia de ABTS 0,2 mM. El ciclo de color azul se realizó a 0 rpm y los ciclos grises desde 500 a 2500 rpm. Las medidas se realizaron en tampón acetato 50 mM, $NaClO_4$ 100 mM, pH 4,2, 27 °C. La velocidad de barrido fue 10 mV/s.

Estos resultados demuestran que se ha conseguido inmovilizar lacasa con una correcta orientación sobre el electrodo de oro modificado, obteniéndose TED entre el centro T1 de cobre de la lacasa y permitiendo la reducción de cuatro electrones de O_2 al agua. La presencia de grupos hidroxilo en la monocapa mixta podría también favorecer una correcta orientación de la lacasa, como ocurre con la celobiosa deshidrogenasa, ya que estas enzimas catalizan la oxidación de sustratos con grupos hidroxilos (Stoica, L.y col., 2005).

Para comprobar que la TED para la inmovilización de la lacasa sobre la monocapa mixta creada sobre el electrodo de oro requiere la estrategia de orientación desarrollada en dos etapas, se modificó un electrodo de oro con la monocapa mixta y se inmovilizó lacasa solo mediante la formación de un enlace amida, es decir sin oxidar previamente los grupos glicosilados de la enzima, y por tanto sin la formación de bases de Schiff. Los resultados de

reducción electroenzimática de O_2 con este electrodo se muestran en la Figura 5.2.13.

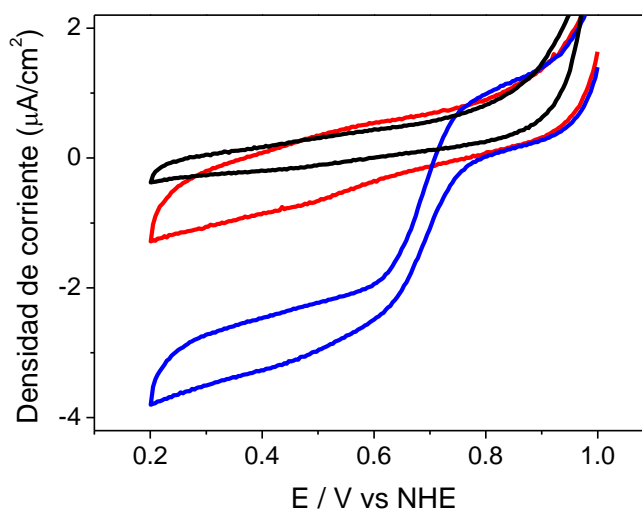


Figura 5.2.13. Voltamperometrías cíclicas con un electrodo de oro modificado con lacasa mediante la formación de un enlace amida. El ciclo de color negro corresponde al control antes de inmovilizar lacasa, el rojo a la medida con tampón saturado en O_2 y el azul al ciclo medido después de añadir ABTS 0,2 mM. Las medidas se realizaron en tampón acetato 50 mM, $NaClO_4$ 100 mM, pH 4,2 y temperatura 27 °C.

No se obtiene apenas TED, pero al añadir mediador redox ABTS la corriente de reducción catalítica de O_2 aumenta. Este resultado indica que existe lacasa activa inmovilizada sobre el electrodo, pero no es capaz de recibir directamente los electrones del electrodo de oro para reducir al O_2 . Esto es debido a que la lacasa tiene la mayoría de sus grupos carboxílicos en el lado opuesto al del centro de Cu T1 (Polyakov, K. M.y col., 2009), por lo que al establecerse enlaces amida la orientación mayoritaria de lacasa será con ese centro redox alejado del electrodo, requiriéndose un mediador redox para establecer la comunicación electrónica con el electrodo.

Las corrientes catalíticas de reducción medidas indican que las moléculas de lacasa inmovilizadas sobre el electrodo son activas, pero no fueron detectadas electroquímicamente señales no catalíticas, asociadas a los centros de cobre de la lacasa. Al igual que con los electrodos de carbono, las medidas se realizaron en ausencia de O_2 dentro de la cámara anaerobia, y no aparecieron picos que claramente se puedan atribuir a los centros de cobre de la lacasa. Este resultado negativo está en consonancia con la submonocapa de

enzima observada por AFM. Cuando los recubrimientos de enzima son del orden de $(3-4) \text{ pmol/cm}^2$ es muy difícil detectar señales redox no catalíticas (Pershad, H. R. y col., 1999) (Sosna, M. y col., 2010). Aunque otros autores detectan en electrodos de oro señales correspondientes a la reducción y reoxidación de los centros de cobre, es dudoso que estas correspondan a lacasa con actividad catalítica significativa, sino probablemente se deban a enzima desnaturalizada (Pita, M. y col., 2006) (Frasconi, M. y col., 2010).

Análisis del efecto del transporte de masa:

Para estudiar el efecto del transporte de sustrato hacia el electrodo modificado en el proceso electrocatalítico, se rotó el electrodo a diferentes velocidades. Se observa que al aumentar la velocidad de rotación del electrodo, y por tanto al aumentar la velocidad de transferencia de O_2 hacia el electrodo, aumentan también las corrientes catalíticas medidas al aire (Figura 5.2.14). Así, cuando el electrodo está estacionario la corriente catalítica medida a 0,4 V fue de $-10,5 \text{ } \mu\text{A/cm}^2$, mientras que cuando se rota a 2500 rpm aumenta hasta $-14 \text{ } \mu\text{A/cm}^2$. El electrodo se rotó hasta 2500 rpm, el máximo posible, sin conseguir alcanzar un plató en la corriente catalítica de reducción de O_2 (Figura 5.2.14), indicándonos que este proceso está controlado por el transporte del sustrato.

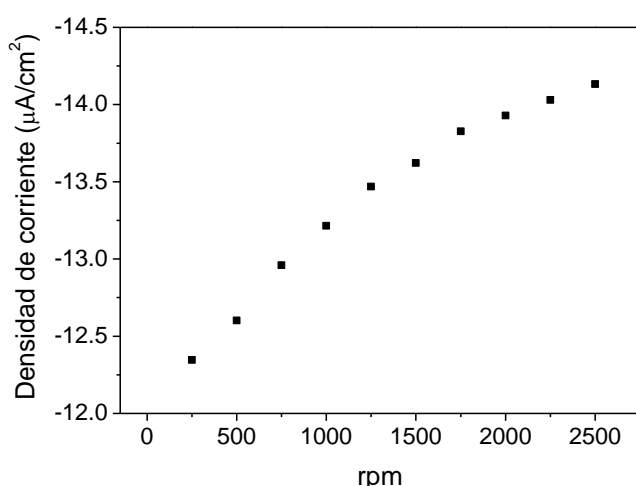


Figura 5.2.14. Densidad de corriente catalítica medida al aire a 0,4 V vs NHE frente a la velocidad de rotación. Las medidas se realizaron en tampón acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM, pH 4,2, 27 °C, a 10 mV/s.

Estas mismas medidas se realizaron bajo condiciones de saturación de O_2 , lo que provoca un aumento de la concentración de sustrato de casi 5 veces. En este caso las corrientes catalíticas aumentaron hasta casi 3 veces más (Figura 5.3.15) que las medidas realizadas en equilibrio con el O_2 atmosférico. Sin embargo, a partir de una velocidad de rotación de 1500 rpm no aumenta la corriente catalítica, lo cual indica que en esas condiciones no limita ya el transporte de O_2 . El hecho de que no se observe un plató en la densidad de corriente a potenciales bajos en el voltamperograma medido bajo O_2 puro y a la máxima velocidad de rotación, sugiere que en estas condiciones el proceso de reducción bioelectrocatalítica de O_2 está limitado por la transferencia electrónica directa entre el centro T1 de la lacasa y el electrodo.

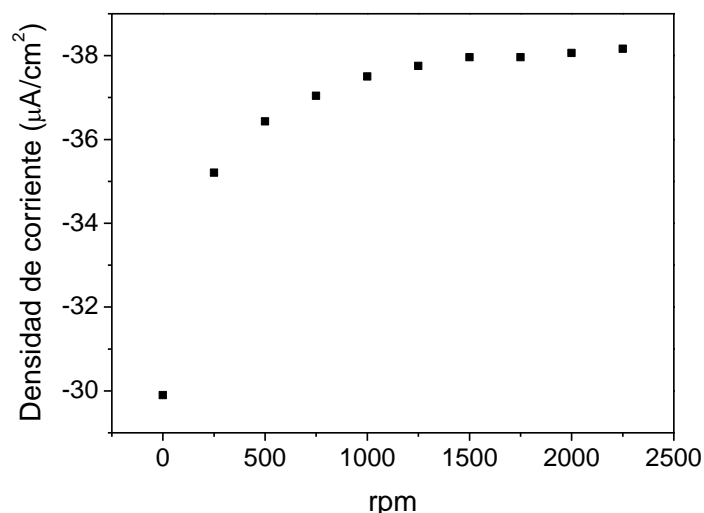


Figura 5.2.15. Densidad de corriente catalítica medida a 0,4 V vs NHE frente a la velocidad de rotación. Las medidas se realizaron en tampón acetato 50 mM, $NaClO_4$ 100 mM, pH 4,2, saturado en O_2 y a 27°C.

Inhibición por haluros:

Se estudió el efecto de inhibición por diferentes concentraciones del ión cloruro en el electrodo de oro modificado con la monocapa mixta y con lacasa inmovilizada en dos etapas por cronoamperometría a 0,4 V, como se hizo con los electrodos de carbono. Cuando se añadió una concentración de Cl^- de 28 mM en el tampón de medida se perdió más de la mitad de la corriente catalítica, en concreto un 58,4 %.

Si se implantara el cátodo desarrollado en el torrente sanguíneo deberíamos tener en cuenta que la concentración de Cl^- mínima en sangre es aproximadamente 90 mM, una concentración tres veces más alta que la concentración estudiada, 28 mM. Es decir, la corriente catalítica del cátodo de lacasa se habría inhibido completamente en las condiciones fisiológicas.

Debido a la gran pérdida de corriente catalítica del electrodo modificado con lacasa causada por la inhibición de Cl^- , se estudió como afectaba la presencia de Cl^- en el electrodo de oro modificado con la monocapa mixta de 4-aminofenilo/MH, pero sin lacasa (Figura 5.2.16).

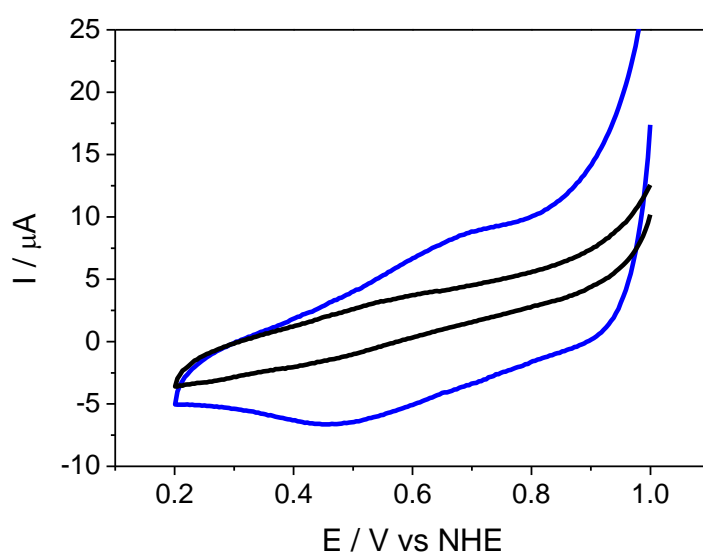


Figura 5.2.16. Voltamperometría cíclica de un electrodo de oro modificado con la monocapa mixta antes (ciclo de color negro) y después de la adición de 140 mM de Cl^- (ciclo de color azul). Las medidas se realizaron en tampón acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM, pH 4,2, 27 ° C, a 10 mV/s.

En los voltamperogramas de la Figura 5.2.16 se observa que la presencia de Cl^- provoca un aumento en la corriente de fondo de un electrodo de oro modificado con la monocapa mixta. Es conocido que el Cl^- se adsorbe sobre electrodos de oro y que al aplicar potenciales positivos se oxidan. Esto sugiere que en los resultados obtenidos por cronoamperometría a 0,4 V, las disminuciones de corriente catalítica de reducción de O_2 medidas no son solamente causados por el efecto de inhibición que los Cl^- provocan sobre la

lacasa, sino que también contribuye en la pérdida de corriente la presencia de Cl^- adsorbidos en el electrodo.

Estabilidad operacional:

Se midió de manera continua por cronoamperometría a 0,4 V, rotando el electrodo a 500 rpm y con el tampón de medida saturado en O_2 , durante 33 h la estabilidad de la corriente catalítica del electrodo modificado, como se muestra en la Figura 5.2.17.

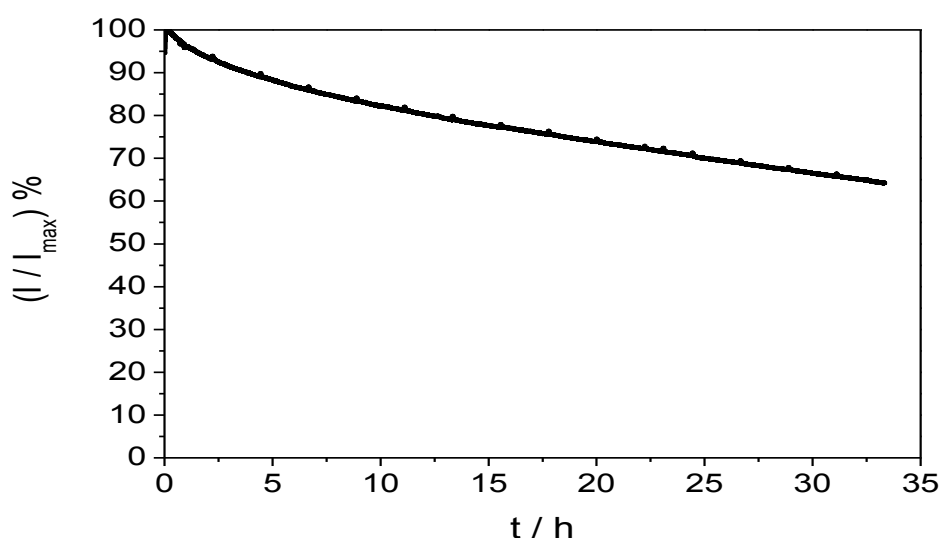


Figura 5.2.17. Corriente bioelectrocatalítica de reducción de O_2 normalizada de un electrodo de oro modificado con monocapa mixta y lacasa en dos etapas. La medida de estabilidad se realizó mediante cronoamperometría a 0,4 V vs NHE, 500 rpm, bajo O_2 . El tampón de medida fue acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM, pH 4,2, y la temperatura 27 °C.

Tras las 33 h de funcionamiento el electrodo mantiene el 65 % de la corriente bioelectrocatalítica. Esta alta estabilidad operacional del electrodo de lacasa podría verse facilitada por la combinación de anillos aminofenilo rígidos y de cadenas flexibles de alcoholes alquílicos en la monocapa mixta sobre el electrodo. Así, los grupos hidroxilos del MH podrían establecer numerosos puentes de hidrógeno con grupos polares de la superficie de la lacasa, que junto con la formación del enlace covalente con los grupos aminofenilos de la monocapa aportarían una inmovilización estable de la lacasa.

5.2.3. Electrodo de oro mesoporoso

Se emplearon electrodos nanoestructurados de oro proporcionados por el grupo del Prof. Edmond Magner de la Universidad de Limerick, Irlanda (Scanlon, M. D.y col., 2012).

En la Figura 5.2.18 se muestra el aspecto que presentan los electrodos mesoporos de oro. Un pegamento aislante recubre parcialmente una placa de oro mesoporoso, de tal manera que se deja expuesto como electrodo un círculo de diámetro de $0,55 \pm 0,05$ cm, por lo que el área geométrica del electrodo resultó ser $0,246 \text{ cm}^2$. Un cable de cobre aislado eléctricamente conecta el electrodo al potencióstato para realizar las medidas electroquímicas. Este montaje no permite utilizar la técnica de rotación del electrodo de trabajo.

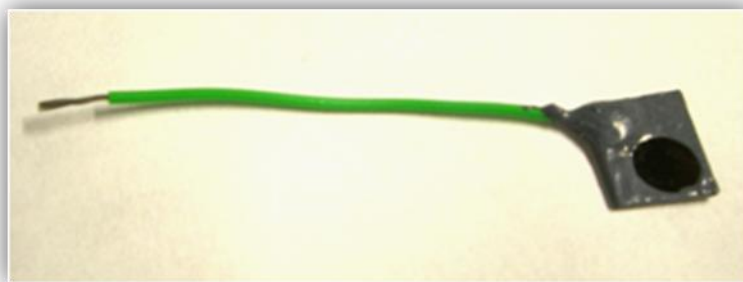


Figura 5.2.18. Fotografía de un electrodo mesoporoso de oro.

Caracterización de los electrodos:

Los electrodos mesoporosos de oro fueron fabricados por Scanlon y cols. salpicando (“sputtering”) una aleación de oro y plata sobre un soporte de cristal y posterior eliminación de la plata. Se emplearon dos tipos de electrodos mesoporosos que presentan diferente morfología y rugosidad debido a que unos fueron preparados con una distribución uniforme de plata y los otros no. La plata se elimina de ambos electrodos calentándolos en ácido nítrico 70 % (w/v) a 40 °C durante 15 min para crear oro mesoporoso (Scanlon, M. D.y col., 2012).

La Figura 5.2.19 muestra imágenes de SEM desde la parte superior y transversal de los dos tipos de electrodos empleados: AuMP-U (electrodo de

oro mesoporoso, modelo uniforme) y AuMP-UN (electrodo de oro mesoporoso, modelo no uniforme).

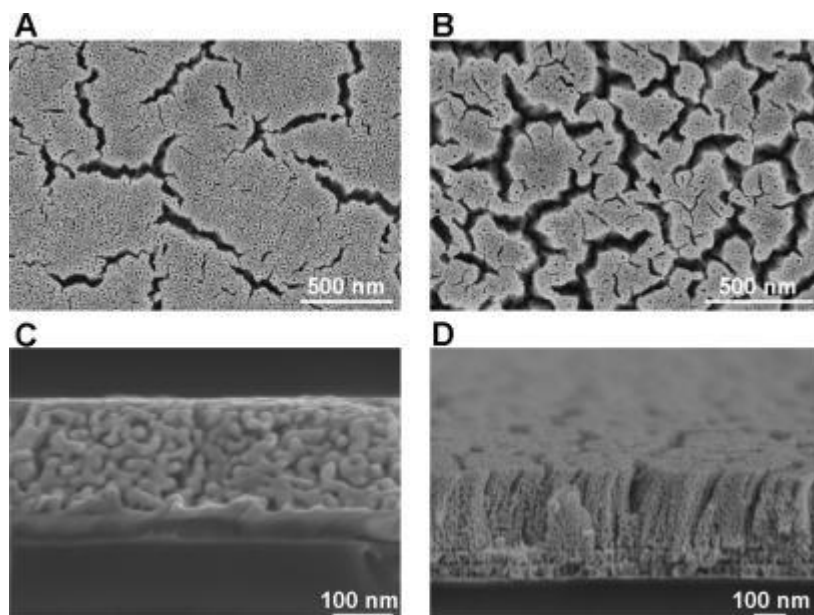
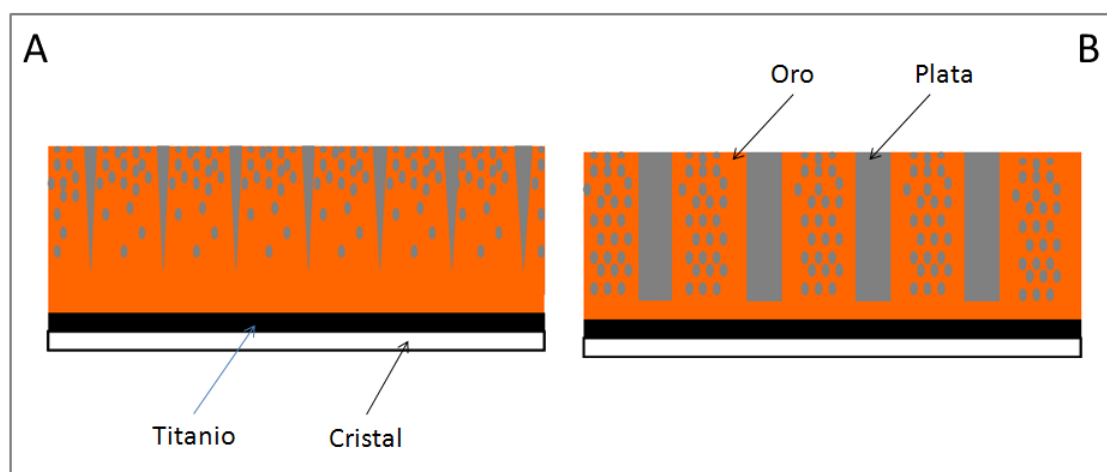


Figura 5.2.19. Imágenes de SEM de los electrodos de oro mesoporosos. Las imágenes A y C corresponden a un electrodo AuMP-U, y las imágenes B y D a un AuMP-NU. Figura tomada de la referencia (Scanlon, M. D. y col., 2012).

En el Esquema 5.2.2, se representa la estructura de los electrodos mesoporosos al realizarles un corte transversal.



Esquema 5.2.2. Representación esquemática del corte transversal de los electrodos de AuMP-U (izquierda) y AuMP-NU (derecha).

La superficie de los electrodos creada por el método no uniforme presenta mayor número de grietas entre las islas de los filamentos de oro que

las obtenidas por el método uniforme. Los tamaños de poros, filamentos y grietas han sido determinados por Scanlon y cols. (Scanlon, M. D.y col., 2012). Estos valores se presentan en la Tabla 5.2.1.

	Poros (nm)	Filamento (nm)	Grieta (nm)
Electrodo AuMP-NU	12-20	15-18	55-65
Electrodo AuMP-U	17-23	18-25	40-55

Tabla 5.2.1. Características estructurales de los electrodos mesoporosos, uniforme y no uniforme. Los datos se obtuvieron de la referencia (Scanlon, M. D.y col., 2012).

Los electrodos mesoporosos se caracterizaron electroquímicamente mediante voltamperometría cíclica en H_2SO_4 0,5 M. Los resultados obtenidos se comparan con los de los electrodos de oro planos (Figura 5.3.20). Los voltamperogramas presentan la forma típica del oro desnudo con un pico pronunciado a 0,8 V vs Ag/AgCl, correspondiente a la reducción de los óxidos de oro.

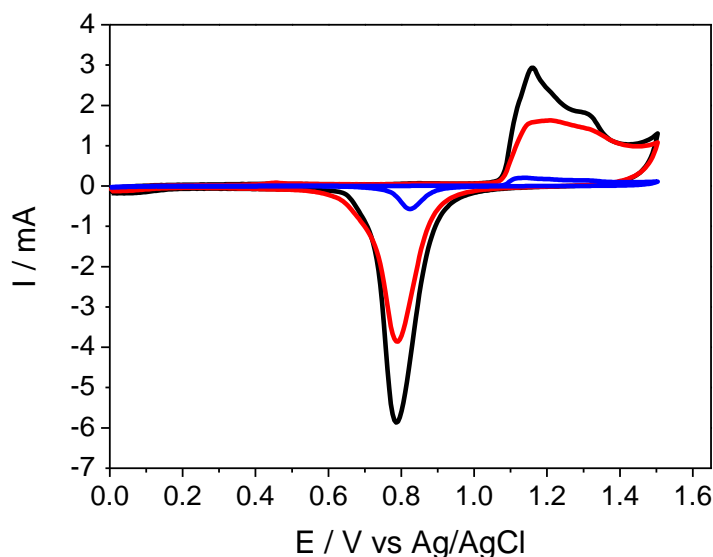


Figura 5.2.20. Voltamperometría cíclica de electrodos de oro. El ciclo negro corresponde al AuMP-NU, el ciclo rojo al AuMP-U y el ciclo azul a un electrodo de oro plano. Las medidas se realizaron en H_2SO_4 0,5 M, 25 ciclos a 20 mV/s.

Se calculó el área real de los electrodos a partir de la integración del pico obtenido en las voltamperometrías realizadas (Figura 5.2.20), empleando como

factor de conversión $482 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ (Oesch, U. y col., 1983). El factor de rugosidad de los electrodos se calculó como el cociente entre el área real y el área geométrica. Los resultados se resumen en la Tabla 5.2.2.

	A real (cm^2)	A geométrica (cm^2)	Rugosidad
Electrodo AuMP-U	3,66	0,246	14,9
Electrodo AuMP-NU	7,47	0,246	30,4
Electrodo oro plano	0,47	0,196	2,4

Tabla 5.2.2. Áreas de los electrodos de oro planos y mesoporosos.

Como puede verse, los electrodos mesoporosos presentan áreas reales siete o quince veces superiores que los electrodos de oro de planos. Aumenta significativamente la superficie electroactiva en estos soportes, por lo que es de interés estudiar aplicaciones bioelectrocatalíticas con estos electrodos, ya que se puede incrementar notablemente el recubrimiento de lacasa sobre el electrodo y en consecuencia las densidades de corriente catalíticas de reducción de O_2 . Así mismo, cabría esperar que las dimensiones nanométricas de poros, grietas y filamentos favorecieran la TED entre electrodo y lacasa.

Funcionalización de la superficie de electrodos AuMP:

Se modificó la superficie de las dos clases de electrodos con la monocapa mixta de 4-aminofenilo/MH optimizada en el apartado anterior. En primer lugar se modificaron electroquímicamente los dos tipos de electrodos con sal de diazonio 4-nitrofenilo 2 mM, como se muestra en la Figura 5.2.21.

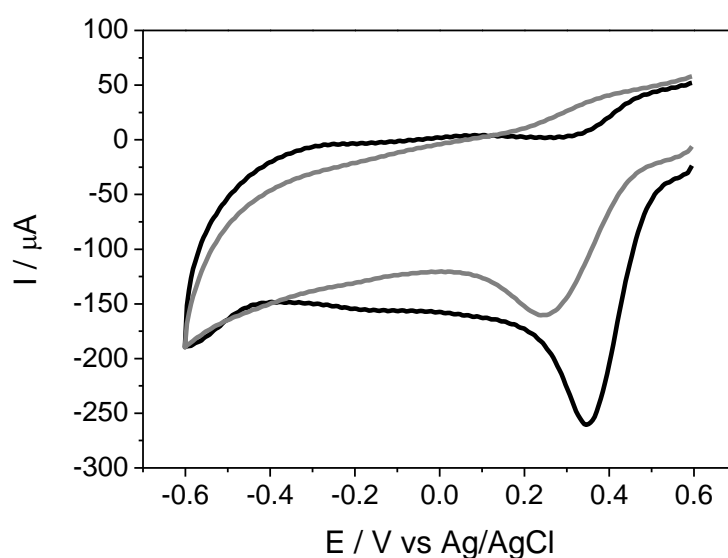


Figura 5.2.21. Voltamperometría cíclica de la reducción de sal de diazonio de 4-nitrofenilo en acetonitrilo sobre electrodos mesoporosos de oro con una velocidad de barrido de 200 mV/s. El ciclo de color negro corresponde al electrodo AuMP-NU y el ciclo de color gris al electrodo AuMP-U.

En la Figura 5.2.22 se muestran los resultados de la reducción de la sal de diazonio sobre varios electrodos de AuMP-NU. Al contrario que en los electrodos de oro planos, por voltamperometría cíclica solamente se aprecia una señal intensa correspondiente a la reducción de la sal de diazonio sobre el oro, la cual en cada electrodo aparece a potenciales diferentes, desde 0,3 V hasta 0,5 V vs Ag/AgCl. Lo mismo ocurre en los electrodos de AuMP-U. Hay el inconveniente añadido de que los electrodos mesoporosos no se pueden flamear para asegurar su limpieza.

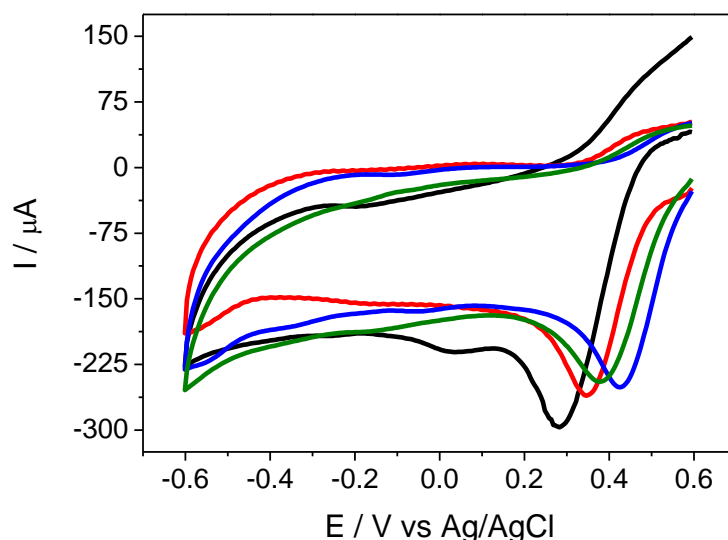


Figura 5.2.22. Voltamperometría cíclica de la reducción de sal de diazonio de 4-nitrofenilo 2 mM en acetonitrilo conteniendo BF_4ClO_4 100 mM con diferentes electrodos de AuMP-NU. La velocidad de barrido fue de 200 mV/s.

Posteriormente se redujeron electroquímicamente los grupos nitro para obtener grupos amino en la superficie de los electrodos. Se calculó el recubrimiento de grupos amino y de hidroxilaminas que se encuentran en la superficie del electrodo cuando se modificaron los electrodos con sal de diazonio 4-nitrofenilo 2 mM. Se obtuvieron recubrimientos de grupos amino muy bajos en ambos tipos de electrodos: $6,22 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$ para AuMP-UN y $1,48 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ para el electrodo AuMP-U. El recubrimiento se calculó en función del área real del electrodo. Se intentó obtener un recubrimiento mayor de los electrodos mesoporsosos de oro aumentando la concentración de la sal de diazonio presente en la celda electroquímica durante la modificación, pero no se obtuvieron resultados que mejoraran los ya mostrados en las Figuras 5.2.21 y 5.2.22. Se atribuye a que, al aumentar la concentración, se promueve la formación de multicapas en lugar de la formación de nuevos enlaces Au-C.

A continuación, el electrodo modificado con aminofenilos se incubó en una disolución 1 mM de MH en etanol durante toda la noche, tal como se hizo con los electrodos planos de oro.

La monocapa mixta creada presenta la señal redox reversible correspondiente a las hidroxilaminas, como se observa en la Figura 5.2.23.

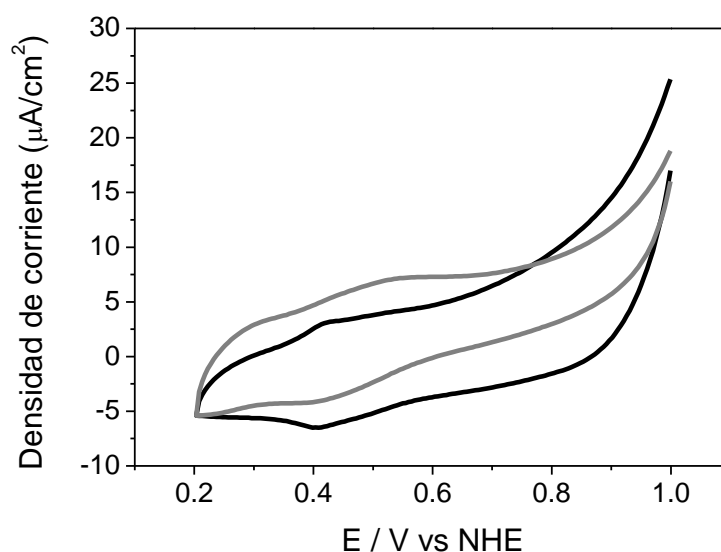


Figura 5.2.23. Voltamperometría cíclica de electrodos AuMP-NU (ciclo de color negro) y AuMP-U (ciclo de color gris) modificados con monocapa mixta 4-aminofenilo/MH. La velocidad de barrido empleada fue 10 mV/s. Las medidas se realizaron en tampón acetato 50 mM, NaClO₄ 100 mM, pH 4,2.

Inmovilización de lacasa sobre electrodos de AuMP:

La lacasa *Th* se inmovilizó covalentemente sobre los dos tipos de electrodos mesoporosos de oro modificados con sal de diazonio 2 mM y MH 1mM, siguiendo la estrategia desarrollada para los electrodos de oro planos (apartado 5.2.3). Dicha estrategia no ofreció resultados positivos de inmovilización orientada de lacasa sobre los electrodos mesoporosos de oro. Se intentó incrementar la carga de lacasa *Th* sobre el electrodo aumentando los tiempos de inmovilización en la primera etapa (entre 6 y 13 horas), y se comprobó que las densidades de corriente catalíticas de reducción de O₂ ofrecidas por estos electrodos aumentaban. Este resultado indica que es necesario un mayor tiempo de inmovilización para que la lacasa pueda difundir hacia las zonas menos accesibles del electrodo, como los poros más pequeños y el fondo de los mesoporos.

En el caso de AuMP-U, el tiempo requerido durante la primera etapa de inmovilización fue de 13 horas. En la Figura 5.2.24 se pueden apreciar las propiedades electrocatalíticas de un electrodo AuMP-U modificado con lacasa

en esas condiciones. Se mide claramente corriente catalítica de reducción de O_2 al potencial redox del centro T1 de la lacasa en comparación con la voltamperometría realizada en presencia de FI^- . Se realizaron medidas al aire y bajo O_2 . Se observa cómo en el voltamperograma realizado al aire, la corriente catalítica de reducción de O_2 alcanza un máximo a $E = 0,65$ V vs NHE y vuelve a disminuir al barrer hacia potenciales más bajos. Este efecto indica un agotamiento del O_2 en las proximidades del electrodo durante el barrido de potencial, por lo que la corriente catalítica está limitada cinéticamente por la difusión del sustrato. Debido a que el ensamblaje de estos electrodos impide su rotación se introdujo agitación magnética en la celda electroquímica para incrementar el transporte hidrodinámico del O_2 hacia el electrodo. Desafortunadamente la agitación magnética incrementó el ruido eléctrico, invalidando la medida.

Cuando se inmoviliza la lacasa sobre electrodos AuMP-U se obtiene una densidad de corriente catalítica de $-35 \mu A/cm^2$ (a $0,4$ V vs NHE) en estado estacionario y en condiciones de saturación de O_2 , mientras que con el electrodo de oro plano, la densidad de corriente catalítica medida en las mismas condiciones fue de $-29,80 \mu A/cm^2$. Luego, con este tipo de electrodos nanoestructurados de oro se consigue un 15 % más de corriente catalítica de reducción de O_2 que con los electrodos de oro planos.

Al añadir ABTS, las corrientes catalíticas obtenidas por TM fueron similares a las obtenidas, indicándonos, que la mayoría de la lacasa activa inmovilizada sobre el electrodo se encuentra con una orientación correcta sobre el electrodo modificado para obtener corrientes bioelectrocatalíticas de reducción de O_2 .

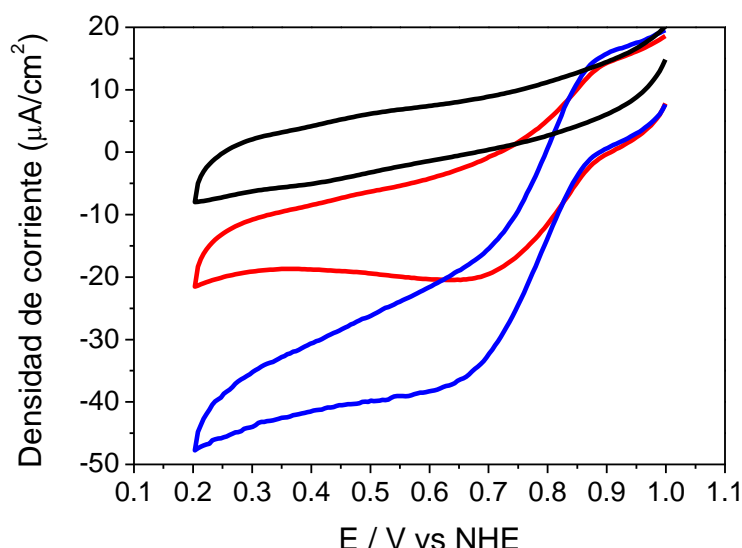


Figura 5.2.24. Respuesta catalítica de un electrodo de AuMP-U modificado con lacasa en dos etapas. El ciclo de color rojo corresponde a la medida realizada al aire, el de color azul a la realizada bajo O_2 y el de color negro a la realizada en presencia de NaF 30 mM. Las medidas de voltamperometría cíclica se realizaron en tampón acetato 50 mM, $NaClO_4$ 100 mM, pH 4,2 y temperatura 27 °C.

El tiempo requerido de inmovilización de lacasa durante la primera etapa en los electrodos de AuMP-NU fue de 6 horas. Esto es debido a que el tamaño que presentan los mesoporos de estos electrodos es mayor que en los electrodos AuMP-U, pudiendo las moléculas de enzima acceder más fácilmente a toda la superficie. Las propiedades electrocatalíticas de un electrodo de AuMP-NU modificado con lacasa se muestran en la Figura 5.2.25, obteniendo reducción electroenzimática de O_2 comenzando a 0,8 V vs NHE. Con este tipo de electrodos siempre se observan claramente en el voltamperograma cíclico dos ondas catalíticas a potenciales distintos. El primer proceso catalítico está centrado a un potencial redox de aproximadamente 0,75 V vs NHE y es similar al observado con los electrodos de Au plano y AuMP-U. El segundo proceso catalítico, con mayores intensidades de corriente, tiene lugar a potenciales menores a 0,3 V vs NHE. Este segundo proceso catalítico no se distingue en los electrodos de oro plano y apenas en los de AuMP-U. Otros autores han atribuido este proceso catalítico a menores potenciales redox a la reducción bieletrónica de O_2 a H_2O_2 catalizada por moléculas de lacasa con el centro T2/T3 en contacto directo con el electrodo (Pita, M.y col., 2006). Para confirmar

esta interpretación, se midió la presencia de agua oxigenada en el tampón de medida, como se describe en el apartado 3.2.4. Después de realizar dos ciclos de voltamperometría con el electrodo AuMP-NU se detectó una concentración de $\text{H}_2\text{O}_2 = 170,7 \mu\text{M}$ en la disolución de la celda electroquímica, en cambio el electrodo AuMP-U produjo únicamente $41,3 \mu\text{M}$, cuatro veces menos que en el caso del electrodo no uniforme.

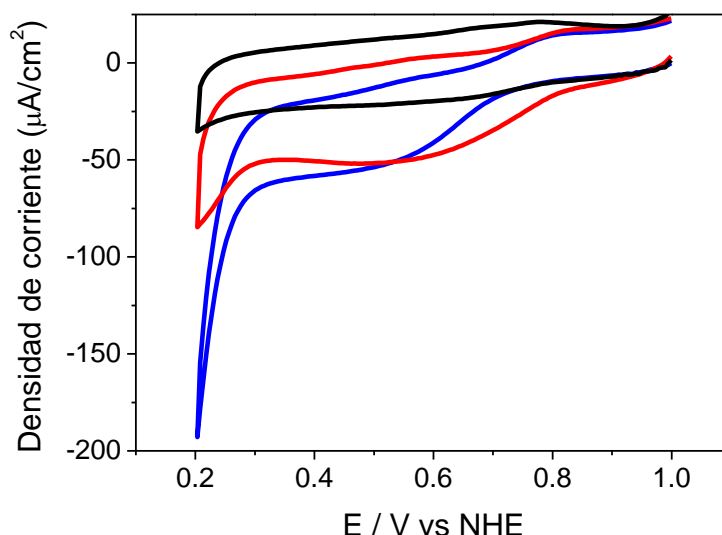


Figura 5.2.25. Voltamperometrías cíclicas con un electrodo de AuMP-NU modificado con lacasa en dos etapas. El ciclo de color rojo corresponde a la medida realizada al aire, el de color azul a la de bajo O_2 y el de color negro a la de en presencia de NaF 30 mM. Las medidas se realizaron en tampón acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM, pH 4,2, 27 °C.

Este resultado podría ser debido a que el electrodo mesoporoso no uniforme posee un tamaño de poro menor que el modelo uniforme y a que las moléculas de lacasa que se encuentran inmovilizadas dentro de los poros pueden estar muy próximas a la superficie de Au en diferentes regiones de su estructura globular simultáneamente. Por lo tanto, pueden establecer TED tanto por el centro redox T1 como por el T2/T3, y catalizar ambas reacciones de reducción de O_2 , total y parcial. Al aplicar altos potenciales se produce en primer lugar la reducción de O_2 a agua a través de centro T1. Al seguir barriendo el potencial a valores más bajos, como la molécula de lacasa se encuentra conectada al electrodo por ambas regiones, se cataliza la reducción de O_2 , pero en este caso a agua oxigenada a través del centro T2/T3 (Pita, M.y col., 2006). Alternativamente, podría interpretarse que existan algunas zonas

de oro desnudas del AuMP-NU, en las que la SAM de tiol no haya recubierto los poros menos accesibles, y como consecuencia se esté reduciendo directamente el O_2 a peróxido de hidrógeno sobre el electrodo, sin que haya catálisis enzimática.

En el voltamperograma realizado con el tampón saturado en O_2 se observa que la reducción de O_2 comienza a 0,7 V vs NHE mientras que el que se realizó al aire lo hace a 0,8 V, si se comparan con el ciclo de color negro (Figura 5.3.25), que corresponde a la enzima inhibida con F^- . Además, bajo saturación de O_2 la densidad de corriente catalítica no aumenta respecto a la medida primero bajo aire, al contrario de lo que se observa en los electrodos de Au plano y AuMP-U. Esta disminución de la densidad de corriente catalítica y del potencial de comienzo podría ser debida a que algunas moléculas de lacasa se estén desnaturalizando directamente sobre el oro, sugiriendo la presencia de zonas desnudas en el oro.

En el caso de los electrodos AuMP-NU la corriente catalítica no aumentó cuando se añadió el mediador redox ABTS, por lo que se concluye que las moléculas de lacasa activas inmovilizadas son capaces de realizar TED, bien por el centro T1, por el centro T2/T3 o por ambos a la vez.

Las densidades de corrientes catalíticas de reducción de O_2 medidas con los electrodos de oro mesoporoso no son tan altas como se esperaba, teniendo en cuenta que los electrodos presentan hasta siete veces mayor área electroactiva que los electrodos de oro plano. Las densidades de corriente obtenidas para ambos tipos de electrodos mesoporosos son similares, $-35 \mu A/cm^2$ (a 0,4 V vs NHE) en el caso de AuMP-U y $-36 \mu A/cm^2$ (a 0,4 V vs NHE) en el caso de AuMP-NU. Solamente se mide un 15 % más de densidad de corriente en los electrodos de oro mesoporosos que en los planos, cuando se compara con el valor medido para el electrodo de oro plano en estado estacionario. Las densidades de corriente catalíticas conseguidas con los electrodos mesoporosos podrían aumentar en ambos casos si se pudieran rotar los electrodos, ya que probablemente las corrientes se encuentran limitadas por difusión del O_2 .

Debido a que no se obtuvieron altas densidades de corrientes catalíticas con los electrodos nanoestructurados de oro, se intentaron mejorar los resultados optimizando el método de inmovilización de la enzima. Para ello se

sonicaron los electrodos durante la primera etapa de inmovilización de la lacasa, ya que al sonicar la muestra se eliminan burbujas de aire atrapadas en los poros por capilaridad, se incrementan la temperatura y la movilidad tanto de las biomoleculas como del líquido atrapado en los poros, esperando que estos efectos promuevan la penetración de la enzima a través de los poros llegando a las zonas que no fueron accesibles anteriormente (Lei, J.y col., 2004).

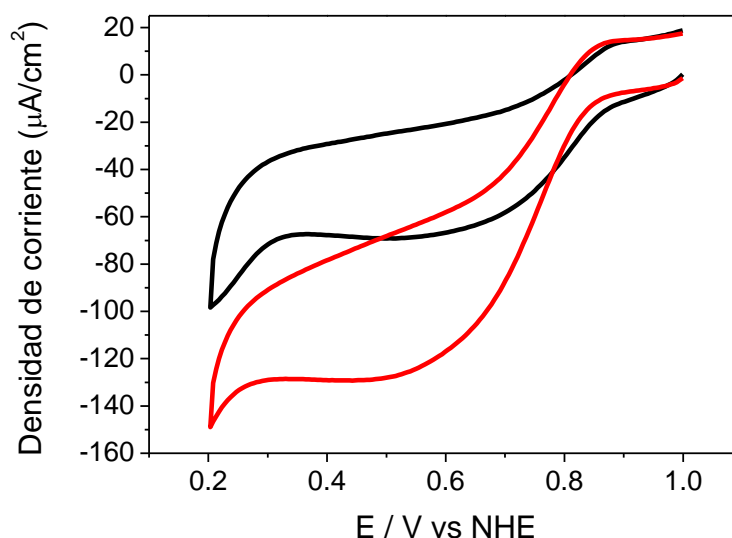


Figura 5.2.26. Voltamperometría cíclica de un electrodo de AuMP-NU modificado con lacasa en dos etapas, sonicando en la primera etapa. Las medidas se realizaron en tampón acetato 50 mM, NaClO₄ 100 mM, pH 4,2, temperatura 27 °C al aire (ciclo de color negro) y saturado en O₂ (ciclo de color rojo). La velocidad de barrido fue 10 mV/s.

Se obtienen buenos resultados sólo en algún experimento, como en el de la Figura 5.2.26. La densidad de corriente catalítica medida fue -120 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, pero con el inconveniente de no ser resultados reproducibles, a pesar que se comprobó que las medidas de actividad catalítica de lacasa en disolución no se veían afectadas por el proceso de sonicación. Otros autores han estudiado la estabilidad termal de la lacasa inmovilizada en electrodos mesoporosos de oro modificados con SAM de 4-ATP, demostrando que mantiene su actividad a 50 °C de temperatura (Hakamada, M.y col., 2012). Por lo que existe la posibilidad de que las temperaturas altas producidas durante la aplicación de ultrasonidos favorezcan la adsorción y desnaturalización de la lacasa sobre regiones de oro desnudo del electrodo mesoporoso.

Teniendo en cuenta que las corrientes catalíticas aumentan bastante al inmovilizar la lacasa mediante ultrasonidos con el electrodo AuMP-NU, se podría concluir que la cantidad de lacasa inmovilizada estaría limitada por su capacidad de difundir a través de los poros.

Inhibición por haluros:

En la Figura 5.2.27, se puede observar el resultado de la adición de diferentes cantidades de cloruro sódico sobre los dos modelos de electrodos de oro mesoporosos funcionalizados con la monocapa mixta, y posterior inmovilización covalente de la lacasa en dos etapas.

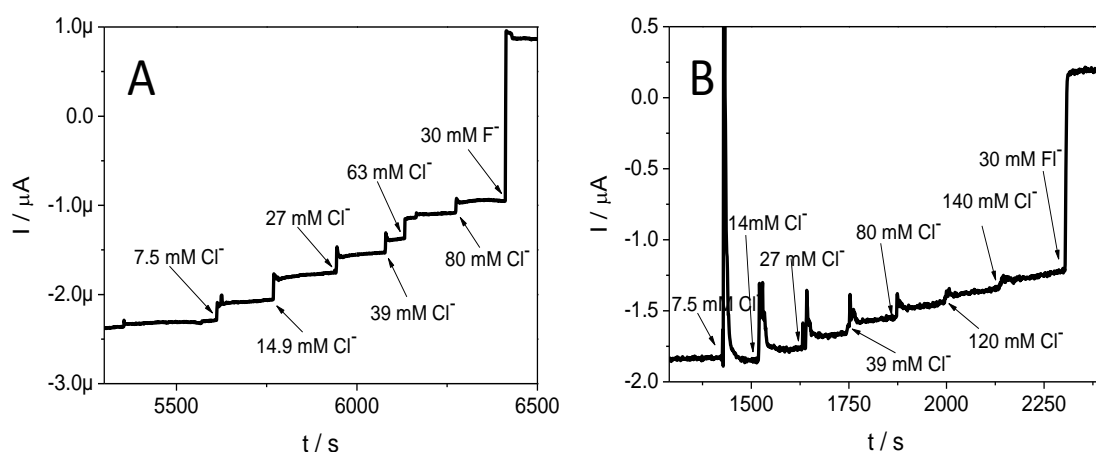


Figura 5.2.27. Efecto de la inhibición de lacasa inmovilizada por haluros sobre la intensidad de corriente catalítica medida en los electrodos de oro mesoporosos, A) AuMP-U. B) AuMP-NU. Las medidas se realizaron por cronoamperometría a 0,40 V vs NHE, en tampón acetato 50 mM, $NaClO_4$ 100 mM, pH 4,2, temperatura 27 °C y rotando la disolución con un imán a 500 rpm.

Se observa que el aumento de la concentración de Cl^- se relaciona con la disminución paulatina de la corriente catalítica. En presencia de una concentración de 80 mM de Cl^- en el medio, se pierde el 60 % de la corriente en los electrodos de AuMP-U. En el caso de los electrodos de AuMP-NU, la pérdida de corriente es menor, sólo del 24 %. Esta diferencia del 36 % en la inhibición puede ser debida a que en el electrodo AuMP-NU los poros son de menor tamaño que en el electrodo AuMP-U y la lacasa podría encontrarse más

encajada, y en consecuencia los iones Cl^- tendrían acceso más complicado a la zona próxima al centro T1.

En todo caso, la estructura mesoporosa que presentan los electrodos AuMP-U y AuMP-UN protege a la lacasa respecto a la inhibición de cloruros, ya que en ambos casos se obtuvieron mejores resultados que con los electrodos de oro planos.

5.2.5. Conclusiones

Se ha conseguido inmovilizar covalentemente lacasa *Th* sobre electrodos de oro planos, manteniendo el 65 % de la corriente bioelectrocatalítica después de estar funcionando en continuo durante más de un día. La orientación de la enzima fue la adecuada, obteniéndose TED y altas densidades de corriente de reducción de O_2 , hasta $-40 \mu\text{A}/\text{cm}_2$.

El empleo de electrodos AuMP sería una alternativa de material de oro nanoestructurado muy interesante para aplicaciones bioelectrocatalíticas, ya que se evitan los fenómenos de agregación que se producen al depositar nanopartículas de oro sobre electrodos, mejorándose la estabilidad y prolongando la vida media de electrodo. Sin embargo, las densidades de corriente obtenidas para reducción de O_2 , no fueron tan altas como se esperaba, teniendo en cuenta que los electrodos AuMP empleados presentan incluso hasta quince veces mayor área real que los electrodos de oro de plano.

Otros grupos de investigación también han empleado soportes mesoporos para la inmovilización de lacasa. Xinhua Xu y cols. atraparon lacasa en soportes inorgánicos y posteriormente lo adsorbieron sobre electrodos de oro. Sin embargo, obtuvieron solamente bajas corrientes de reducción de O_2 en presencia de un mediador (Xu, X.y col., 2009). Huajun y cols. adsorbieron directamente lacasa sobre electrodos mesoporosos de oro empleando diferentes tamaños de poro. Los mejores resultados lo consiguen con un tamaño mayor a los empleados en este trabajo, 40-50 nm. Aún así, obtienen también bajas densidades de corriente de reducción de O_2 (Qiu, H.y col., 2008).

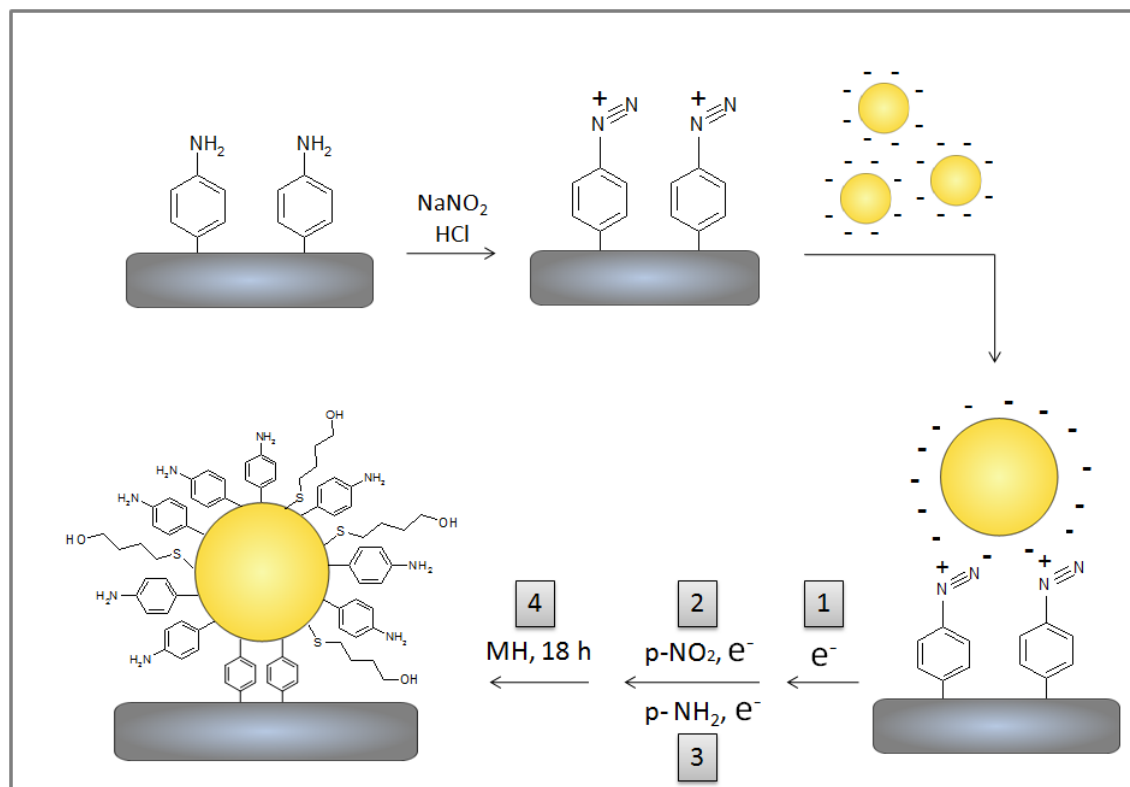
Otro tipo de estructura mesoporosa de oro se obtiene mediante la deposición sucesiva de AuNP sobre electrodos de oro, como lo realizan Murata y cols. obteniendo un alto recubrimiento de oro y una rugosidad de 72 (Murata, K.y col., 2010). En esta clase de electrodos no se ha inmovilizado hasta el momento lacasa. Sin embargo, Wang y cols. la densidad de corriente de reducción de O_2 que midieron fue $75 \mu A/cm^2$ adsorbiendo físicamente bilirrubina oxidasa (Wang, X.y col., 2012).

5.3. Electrodos LDG-AuNP

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos al desarrollar electrodos nanoestructurados de lacasa basados en las estrategias optimizadas en los capítulos anteriores. El objetivo planteado corresponde a la modificación controlada a nivel nanométrico de electrodos de grafito y oro respectivamente. Para ello, en primer lugar se funcionalizaron electrodos LDG mediante reducción de sal de diazonio y luego se inmovilizaron covalentemente nanopartículas de oro (AuNP) en la estructura porosa del grafito. A continuación, se funcionalizaron las AuNP con la monocapa mixta desarrollada en el capítulo anterior para electrodos de oro (5.2.2) para inmovilizar de forma orientada y covalente lacasa *Th*. Se estudió el efecto de las AuNP en las propiedades bioelectrocatalíticas de lacasa inmovilizada para comprobar si actuaban como puentes electrónicos para la TED entre lacasa y electrodo.

5.3.1 Preparación de la superficie

5.3.1.1. Funcionalización del electrodo



Esquema 5.3.1. Representación esquemática de las diferentes etapas para la construcción de los electrodos LDG-AuNP.

Primero se funcionalizaron los electrodos LDG como se indica en el apartado 5.1.1.1, incorporando grupos 4-aminofenilo a su superficie. Dichos grupos amino se transformaron en grupos azo *in situ*, usando nitrito sódico y HCl (Freeman, H. S. y col., 1986), quedando cargada positivamente la superficie del electrodo. Esto permite adsorber las nanopartículas de oro (AuNP) de (5 ± 3) nm sobre el electrodo LDG por interacciones electroestáticas, ya que están cargadas negativamente (Duff, D. G. y col., 1993) (Esquema 5.3.1). Por quimisorción espontánea de la sal de diazonio sobre el oro se creó un enlace covalente entre las AuNP y el electrodo funcionalizado (Podvorica, F. I. y col., 2009) (Laurentius, L. y col., 2011). A continuación, se realizó un barrido de potenciales entre 0,6 y -0,6 V vs Ag/AgCl en tampón acetato 50 mM pH 4,2 para reducir los grupos azo de la superficie del electrodo que no hubieran reaccionado todavía con las AuNP y aumentar el número de enlaces C-AuNP formados (Esquema 5.3.1, etapa 1). Como se observa en la voltamperometría de la Figura 5.3.1, la reducción de los grupos azo del electrodo tiene lugar a -0,2 V vs Ag/AgCl. Si comparamos este valor con el potencial al cual se produce la reducción de la sal de diazonio en disolución sobre el oro plano (0,2 V vs Ag/AgCl) y sobre los electrodos LDG (0,45 V vs Ag/AgCl), se observa que la señal redox se ha desplazado significativamente hacia valores más negativos. Este desplazamiento se explica porque en este caso, no se está reduciendo un compuesto en disolución sino una especie inmovilizada con el grupo azo no orientado hacia el electrodo, y por tanto la reacción redox tendrá lugar a una distancia mayor. En consecuencia, existe una mayor limitación cinética del proceso, que se traduce en un desplazamiento del potencial de reducción hacia valores más negativos.

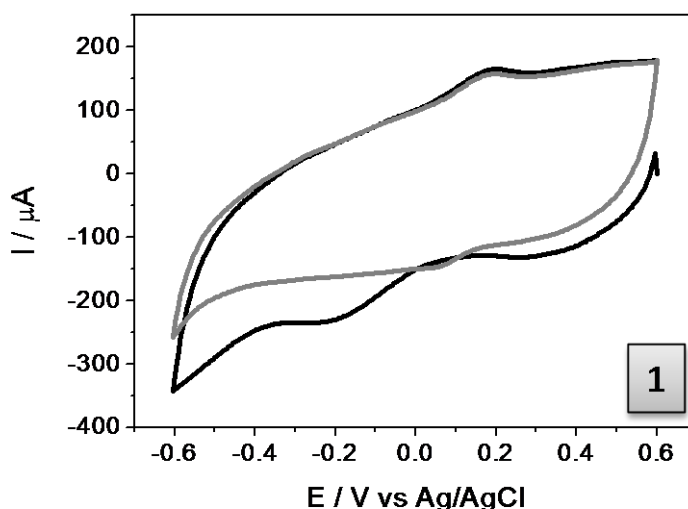


Figura 5.3.1. Modificación electroquímica de un electrodo LDG, funcionalizado con grupos azo, con AuNP de 5 nm de diámetro en tampón acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM, pH 4,2. La velocidad de barrido fue 0,2 V/s. El primer ciclo se representa en color negro y el segundo ciclo en gris.

A continuación el electrodo LDG-AuNP se funcionalizó de manera análoga a como se hizo con los electrodos de oro planos para formar la monocapa mixta de 4-aminofenilos/MH (apartado 5.2.2), con la intención de funcionalizar las AuNP. En una segunda etapa se modificó electroquímicamente el electrodo LDG-AuNP con sal de diazonio de 4-nitrofenilo 2 mM (Laurentius, L.y col., 2011), para posteriormente reducir por el método electroquímico habitual los grupos nitro incorporados sobre el electrodo a grupos amino (Esquema 5.3.1, etapa 3). Por último lugar, en la cuarta etapa se sumerge el electrodo en una disolución de MH 1mM durante 18 horas para generar una SAM de tioles. De esta manera se recubren aquellas regiones desnudas de las AuNP que la sal de diazonio no modificó.

En la Figura 5.3.2 se muestran los voltamperogramas de la funcionalización del electrodo LDG-AuNP.

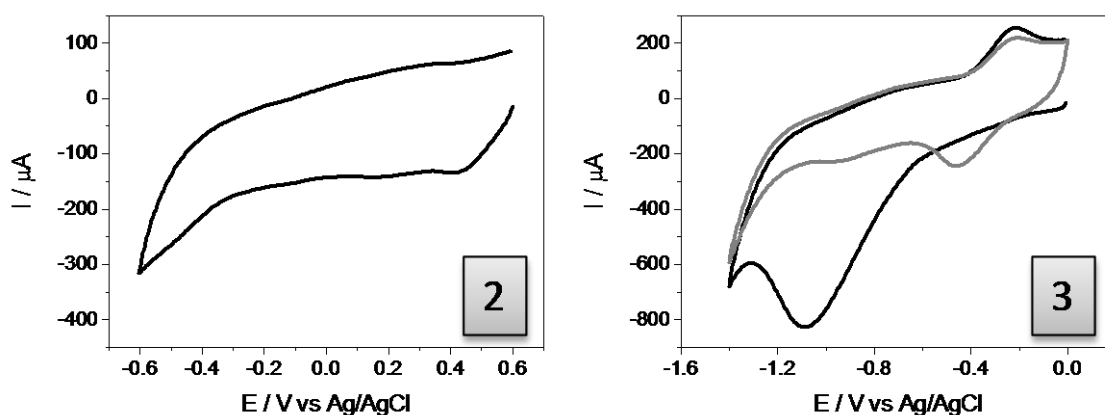


Figura 5.3.2. 2) Modificación electroquímica de un electrodo LDG-AuNP con sal de diazonio 4-nitrofenilo 2 mM en acetonitrilo conteniendo BF_4ClO_4 100 mM. 3) Reducción electroquímica en EtOH/ H_2O 1:9, 0,1 M KCl. La velocidad de barrido empleada en ambos casos fue 200 mV/s.

5.3.1.2. Caracterización de los electrodos modificados y estudio del tiempo de incubación de AuNP

La presencia de Au depositado sobre el electrodo LDG-AuNP se demostró mediante voltamperometría cíclica en H_2SO_4 0,1 M (Mirkhalaf, F.y col., 2010). Se observan en la voltamperometría realizada al electrodo LDG-AuNP en H_2SO_4 los procesos de oxidación y reducción propios del oro (Figura 5.3.3, ciclo de color gris) en comparación con un electrodo control no modificado con AuNP (Figura 5.3.3, ciclo de color negro). Los voltamperogramas presentados en la Figura 5.3.3 confirman sin duda la presencia de oro en la superficie del electrodo LDG-AuNP. Los picos redox típicos de Au que se detectan muestran varios hombros que pueden atribuirse a la heterogeneidad del electrodo. Es de esperar que la oxidación y reducción del oro superficial de las nanopartículas aparezca a valores de potencial ligeramente diferentes al del oro policristalino (Jirkovský, J. S.y col., 2010) (Mirkhalaf, F.y col., 2010).

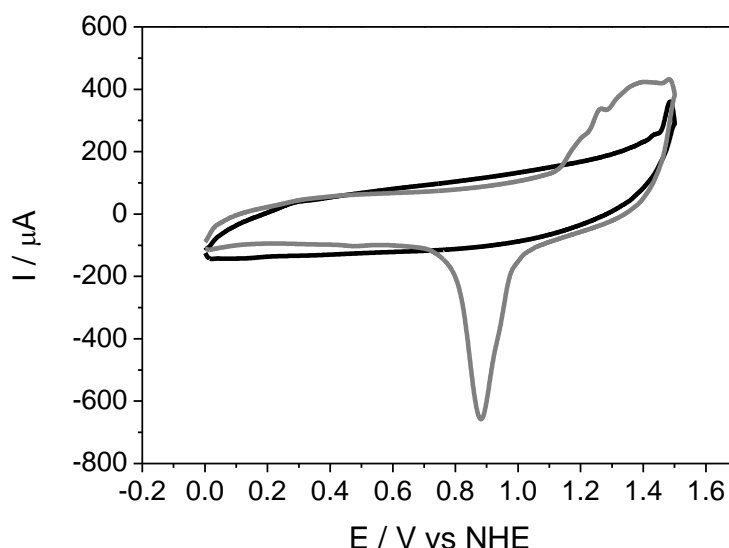


Figura 5.3.3. Voltamperogramas cíclicos de un electrodo LDG-AuNP (ciclo de color gris) y electrodo LDG sin AuNP (ciclo de color negro) en H_2SO_4 0,1 M a 200 mV/s.

Tras obtener evidencia electroquímica de la inmovilización de las AuNP sobre el electrodo LDG, se procedió a estudiar el efecto de diferentes tiempos de incubación de AuNP sobre el electrodo LDG modificado con grupos azo, con el fin de maximizar el recubrimiento. Debido a la estructura porosa que presenta el electrodo LDG, se emplearon electrodos HOPG “edge”, menos rugoso y de área electroquímica más reproducible (McCreery, R. L., 2008), para poder cuantificar con mayor exactitud la cantidad de AuNP depositadas. La cuantificación del oro inmovilizado sobre los electrodos se realizó integrando el pico de reducción de los óxidos de Au formados por voltamperometría cíclica. Para ello se tiene en cuenta que la carga requerida para la reducción de una monocapa de óxido en el oro según Oersch y cols es $482 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ (Oesch, U. y col., 1983).

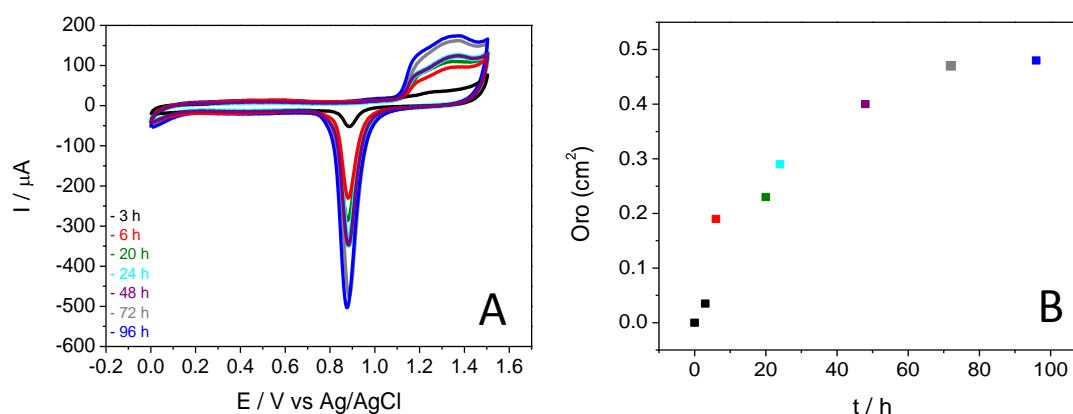


Figura 5.3.4. A) Voltamperogramas cíclicos de electrodos HOPG-AuNP incubados con AuNP a diferentes tiempos. Las medidas se realizaron en H_2SO_4 0,1 M a 200 mV/s. B) Superficie de oro electroactiva que presentan los electrodos HOPG de la gráfica A en función del tiempo de incubación de las AuNP.

En la Figura 5.3.4 se muestra que tan sólo con 3 horas de incubación ya comienza a recubrirse el electrodo con AuNP y que a partir de 72 horas los resultados del recubrimiento de oro en la superficie del electrodo son muy similares. El recubrimiento máximo de oro que se obtuvo fue de $0,5\text{ cm}^2$. Para ello el electrodo HOPG, que presenta un área geométrica de $0,196\text{ cm}^2$, se incubó durante 3 días con AuNP. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con electrodos HOPG, se realizaron los experimentos de incubación de AuNP sobre electrodos LDG durante 3 horas ó 3 días, obteniéndose un recubrimiento de oro de $0,27$ y $1,43\text{ cm}^2$ respectivamente (Figura 5.3.5). El mayor recubrimiento obtenido sobre electrodos LDG respecto al HOPG está de acuerdo con su estructura porosa y mayor área electroactiva.

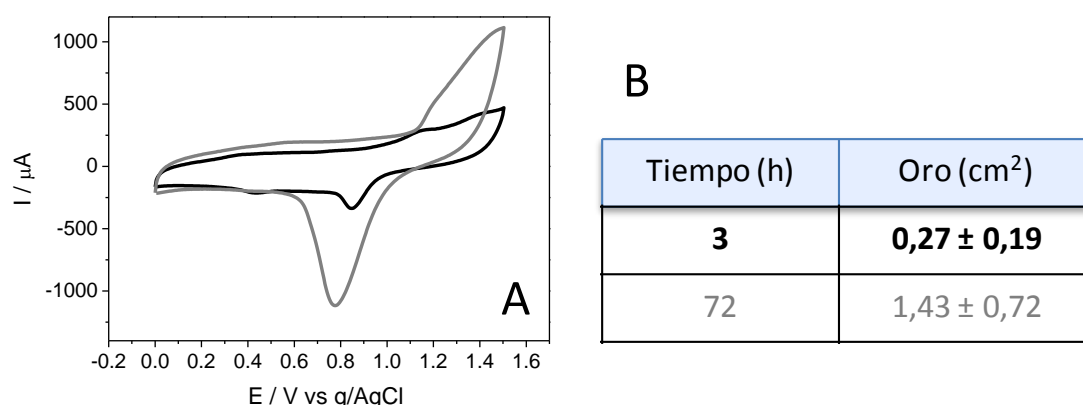


Figura 5.3.5. A) Voltamperogramas cíclicos de electrodos LDG-AuNP después de 3 horas (ciclo de color negro) ó 3 días (ciclo de color gris) de incubación con AuNP. Las medidas se realizaron en H₂SO₄ 0,1 M a 200 mV/s. B) Tabla con los resultados obtenidos de recubrimiento de oro en función del tiempo de incubación.

Para estudiar la estabilidad de los electrodos LDG-AuNP se realizaron experimentos después de incubar AuNP con el tiempo establecido anteriormente de 3 días sobre un electrodo LDG modificado y sobre un electrodo control con LDG no funcionalizado. Se cuantificó el oro en ambos electrodos y después de dos días se cuantificó de nuevo mediante voltamperometría cíclica en H₂SO₄ 0,1 M. Se observó que en el electrodo LDG desnudo, después de haber estado almacenado durante dos días, se pierde entre el 50 y 60 % de oro respecto de la cantidad inicial. Mientras, en el electrodo LDG-AuNP no se observaron pérdidas significativas de oro. Por lo tanto, la formación del enlace covalente entre el electrodo LDG funcionalizado y las AuNP proporciona una alta estabilidad del electrodo nanoestructurado. Laurentius y cols. han demostrado que las AuNP modificadas con nitrobencono son estables hasta un mes (Laurentius, L.y col., 2011).

Una cuestión importante es investigar cómo afecta el proceso de inmovilización a la estructura y morfología de las AuNP unidas a los electrodos LDG. Para ello se pulieron los electrodos LDG-AuNP con papel de lija realizando cinco ochos y las virutas de carbono generadas se observaron por microscopía electrónica de transmisión acoplada a un detector de energía dispersiva de rayos X (TEM-EDX) (Figura 5.3.6). Las primeras corresponden a

un electrodo con las AuNP fisisorbidas y las segundas a un electrodo LDG-AuNP donde las AuNP se unieron covalentemente.

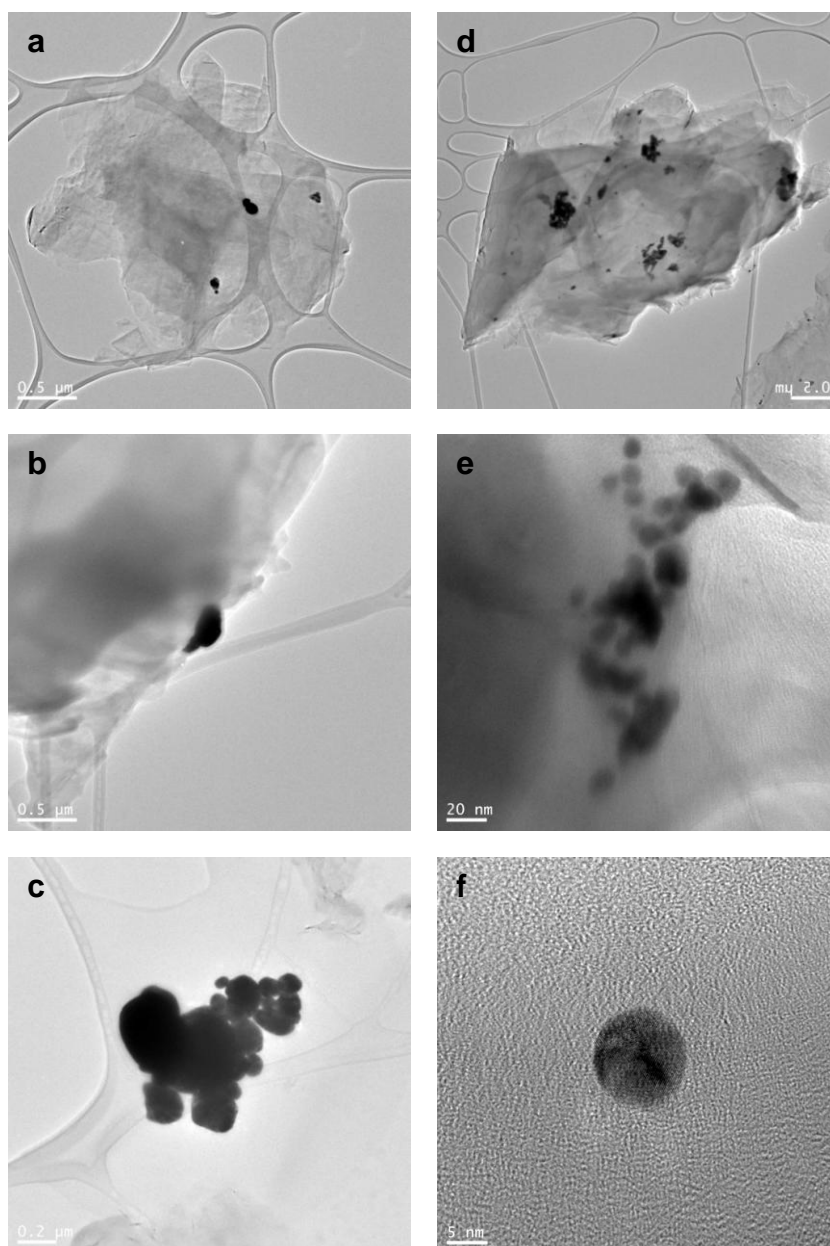


Figura 5.3.6. Imágenes obtenidas mediante TEM de virutas de electrodos LDG-AuNP. a-c) AuNP adsorbidas sobre electrodo LDG; d-f) AuNP unidas covalentemente al electrodo LDG.

El análisis por EDX indicó que las zonas de contraste oscuro en las imágenes corresponden a Au depositado sobre partículas de carbono. Las imágenes de la Figura 5.3.6 indican que las AuNP fisisorbidas sobre el electrodo se agregan en grandes aglomerados de oro, que pueden alcanzar

dimensiones del orden de micras. Este hecho se explica por el tratamiento electroquímico realizado en H_2SO_4 para cuantificar el oro inmovilizado sobre electrodo, el cual provoca la aleación de AuNP para formar partículas más grandes (Murata, K.y col., 2010). En cambio, la muestra correspondiente a las AuNP unidas covalentemente al grafito muestran una cantidad mayor de Au sobre la superficie de las virutas de grafito. Las AuNP unidas por enlace covalente también presentan una alteración menor de su morfología y tamaño, como se muestra en la Figura 5.3.6. Solo en algunos casos se aprecian agregados de AuNP, pero de bastante menor magnitud que cuando no se unieron covalentemente.

Hay que señalar que la preparación de la muestra para el análisis por TEM-EDX incluye etapas que pueden afectar a la propia estructura del material compuesto grafito-AuNP. Sin embargo, la estructura porosa y el tamaño que presenta el LDG imposibilita su estudio directo por TEM-EDX. A pesar de las dificultades que pudieron surgir, el método de lijado del electrodo y análisis de las virutas de grafito permitió identificar las AuNP inmovilizadas y determinar que mayoritariamente mantenían su tamaño tras su unión covalentemente al electrodo LDG (Figura 5.3.6 f).

Mediante esta estrategia desarrollada para la inmovilización covalente de AuNP sobre electrodos de LDG se obtiene un recubrimiento de oro significativamente mayor que el obtenido por electrodeposición de AuNP directamente sobre electrodos de carbono (Hezard, T.y col., 2012). La electrodeposición conlleva a un recubrimiento de oro de $0,53 \text{ cm}^2$ para el mismo área geométrica de electrodo. Además, la caracterización realizada de los electrodos LDG-AuNP por TEM nos indica que la unión covalente mantiene estables las AuNP, conservando sus características iniciales (Figura 5.3.6 f). Se ha evitado el aumento de tamaño de las partículas de oro debido a nuevas nucleaciones y la formación de pequeños agregados, efectos que suceden bien al someter la muestra a un tratamiento térmico a altas temperaturas con la intención de eliminar reactivos estabilizantes (Naruse, J.y col., 2011), o bien a Hezard y cols cuando emplearon un elevado número de ciclos al realizar la modificación electroquímica del electrodo con AuNP (Hezard, T.y col., 2012). A Murata y cols. les sucedió el mismo efecto al depositar directamente AuNP sobre electrodos de oro, ya que, las AuNP que sintetizaron de 15 nm

multiplicaron por tres su tamaño después del tratamiento electroquímico con H_2SO_4 .

5.3.2. Inmovilización de lacasa Th

La Figura 5.3.7 muestra los voltamperogramas de reducción electroenzimática de O_2 obtenidos al inmovilizar lacasa en dos etapas (apartado 5.1.1) sobre electrodos LDG-AuNP, los cuales fueron incubados previamente con AuNP durante 3 horas (A y B) ó 3 días (C y D) respectivamente.

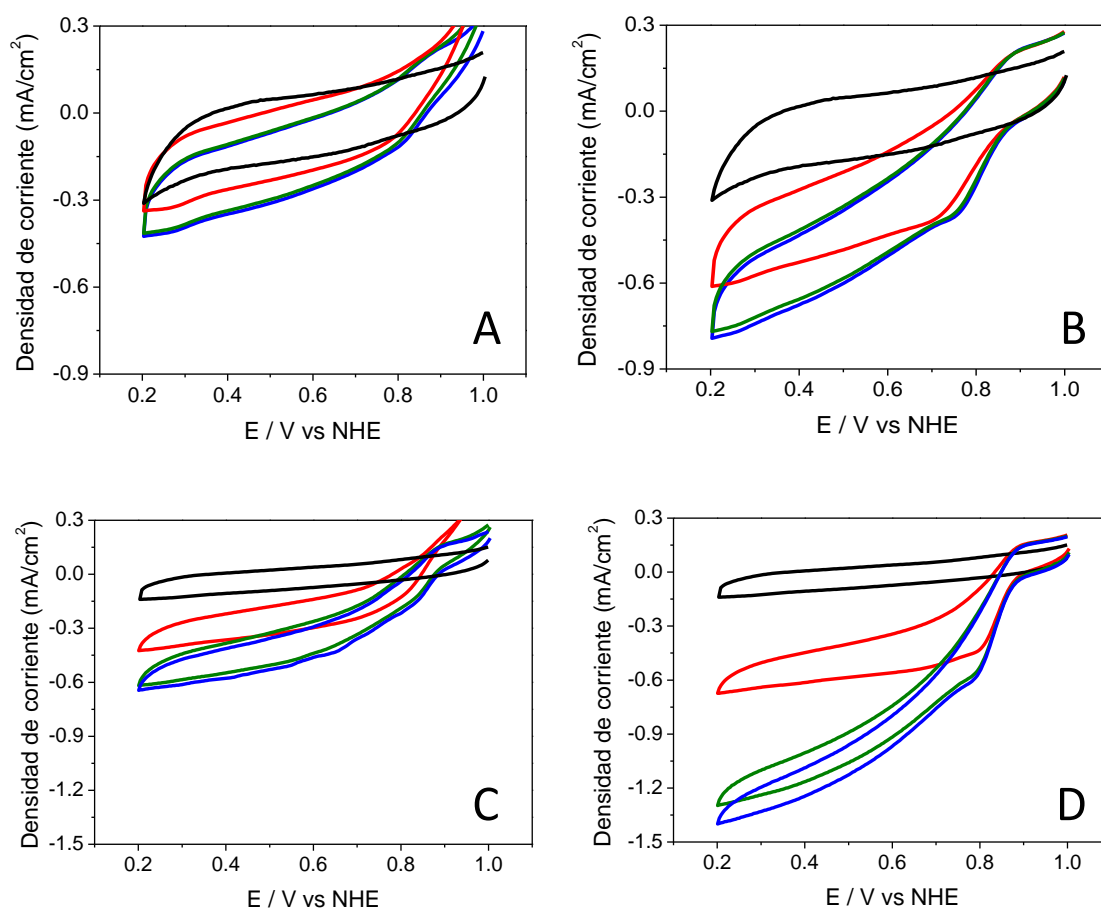


Figura 5.3.7. Respuesta bioelectrocatalítica de reducción de O_2 de los electrodos LDG-AuNP-3 horas (A y B) y LDG-AuNP-3 días (C y D) con lacasa inmovilizada en dos etapas. Las medidas voltamperométricas se realizaron en tampón acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM, pH 4,2, 27 °C, al aire (A y C) o bajo O_2 (B y D). La velocidad de barrido fue 10 mV/s. El ciclo de color rojo se realizó a 0 rpm, ciclo verde a 500 rpm, ciclo azul a 1000 rpm y el ciclo de color negro en presencia de F^- 30 mM.

Se obtuvo bioelectrorreducción de O_2 con ambos electrodos, LDG-AuNP (3 horas) y LDG-AuNP (3 días), modificados con lacasa. El O_2 comienza a reducirse al potencial 0,850 V vs NHE cercano al potencial del centro T1 de la lacasa, tal como se aprecia al comparar con los voltamperogramas realizados cuando la enzima se encontraba inhibida con F^- .

Las densidades de corriente obtenidas en presencia de O_2 puro (Figura 5.3.7, B y D) son el doble que en las medidas realizadas al aire (Figura 5.3.7, A y C) con los dos electrodos. Sin embargo, los valores absolutos obtenidos son diferentes. Como se resume en la Tabla 5.3.1, se obtienen corrientes catalíticas mayores con el electrodo que se incubó en presencia de AuNP durante 3 días. Este electrodo se caracterizaba por una cantidad de oro mayor que el electrodo incubado en AuNP únicamente durante 3 horas (Figura 5.4.4), por lo que el uso de mayor cantidad de AuNP favorece la obtención de altas corrientes catalíticas, no sólo a bajos potenciales, si no que mejora considerablemente la corriente a altos potenciales. Este resultado sugiere que se produce un aumento en la constante de transferencia electrónica heterógena entre enzima y electrodo cuando aumenta la cantidad de AuNP inmovilizadas, lo cual se manifiesta en el menor sobrepotencial requerido por parte del electrodo para obtener densidades de corrientes altas (Léger, C.y col., 2008). Por lo tanto, se puede concluir que las AuNP actúan como puentes electrónicos aumentando la velocidad de transporte de electrones del electrodo al centro Cu T1 de la lacasa, de modo similar a como Abad y cols. describieron para la enzima galactosa oxidasa (Abad, J. M.y col., 2009).

	3 horas	72 horas
0,8 V vs NHE	$-(265 \pm 3) \mu A/cm^2$	$-(378 \pm 11) \mu A/cm^2$
0,4 V vs NHE	$-(501 \pm 12) \mu A/cm^2$	$-(1072 \pm 18) \mu A/cm^2$

Tabla 5.3.1. Corrientes catalíticas de reducción de O_2 medidas en tampón acetato 50 mM, $NaClO_4$ 100 mM, pH 4,2, 27 °C, bajo O_2 , a diferentes potenciales con electrodos LDG-AuNP-lacasa, en los cuales las AuNP se depositaron durante 3 horas (n=7) ó 72 horas (n=10).

Para estudiar la dependencia de la corriente catalítica frente al transporte de O_2 se compararon los voltamperogramas realizados a diferentes

velocidades de rotación a saturación de O_2 (Figura 5.3.7, B y D). En el electrodo LDG-AuNP (3 horas) se observa un aumento del 20% en la densidad de corriente cuando la medida se llevó a cabo bajo rotación a 500 rpm respecto a cuando se realizó en condiciones estacionarias. Sin embargo, con el electrodo LDG-AuNP (3 días) el aumento que se produjo en la corriente fue del 50 %. Además, en el electrodo LDG-AuNP (3 horas) las velocidades de rotación mayores de 500 rpm no afectaron a las corrientes catalíticas, mientras que en el electrodo LDG-AuNP (3 días) sí aumentó la corriente catalítica. Estos resultados indican que hay una mayor limitación cinética del transporte de O_2 en el segundo caso, lo cual se puede atribuir a una mayor velocidad de consumo del sustrato en las inmediaciones de la superficie del electrodo, hecho constatado por las mayores corrientes electrocatalíticas de reducción obtenidas. El mayor consumo de O_2 en el electrodo puede deberse a que haya una cantidad de lacasa mayor inmovilizada en los electrodos LDG-AuNP (3 días) o a que en esos electrodos la transferencia electrónica heterogénea sea más rápida. Dado que en ambos casos la inmovilización de lacasa se hace del mismo modo, y que la lacasa puede unirse covalentemente tanto a los grupos amino de las AuNP como a los del LDG, se puede concluir que el mayor consumo de O_2 en el electrodo se debe principalmente a una mayor proporción de uniones lacasa-AuNP que lacasa-LDG; habiéndose constatado que la velocidad de TED de la lacasa-AuNP es mayor (Tabla 5.3.1) y dicho electrodo tiene una mayor cantidad de AuNP unidas al electrodo (Figura 5.3.5).

En la Figura 5.4.8, se observan los resultados a saturación de O_2 representados en la Figura 5.3.7 D tras la sustracción del voltamperograma medido en presencia del inhibidor F^- , que se toma como blanco. Se puede observar que la onda catalítica de reducción comienza a 0,88 V vs NHE, lo que nos indica que mediante este método de inmovilización se obtiene un sobrepotencial menor para la reducción electroenzimática de O_2 que en el resto de los métodos estudiados en los capítulos anteriores. En el ciclo de color rojo, realizado en condiciones estacionarias, se alcanza un plató a 0,80 V vs NHE, mientras que cuando el electrodo se rota a diferentes velocidades aumentan las corrientes pero no se obtiene un plató. En el primer caso el plató se produce por la limitación cinética por transporte de O_2 .

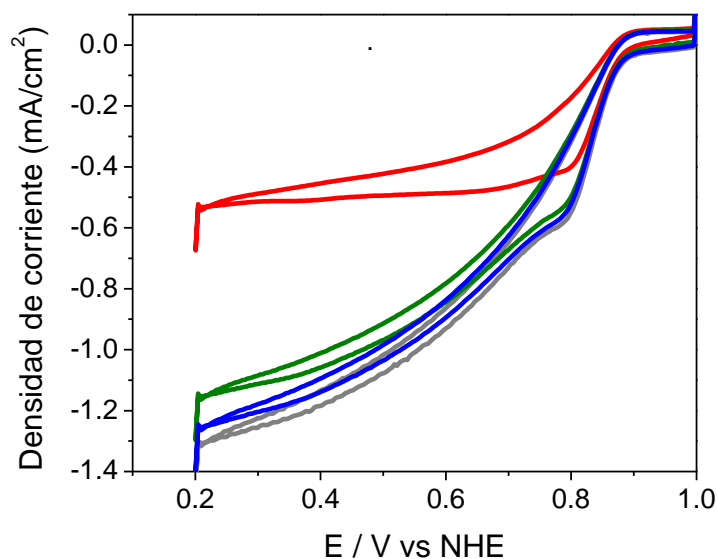


Figura 5.3.8. Voltamperogramas cíclicos del electrodo LDG-AuNP(3 días)-lacasa después de sustraer el voltamperograma en presencia de F^- (Figura 5.4.7, D). El ciclo de color rojo corresponde a una velocidad de rotación de 0 rpm, color verde a 500 rpm, color azul 1000 rpm y color gris a 1500 rpm.

En los voltamperogramas realizados con rotación se observan dos procesos catalíticos con diferentes cinéticas. Uno se observa entre 0,88 y 0,78 V vs NHE, teniendo la onda catalítica forma sigmoideal e independiente de la velocidad de rotación. El segundo proceso catalítico se observa que comienza a potenciales menores, 0,76 V vs NHE, y en el cual la corriente va aumentando con el sobrepotencial respecto al termodinámico de reducción del O_2 . Este fenómeno podría explicarse por la existencia de dos posibles orientaciones diferentes de lacasa inmovilizada. Una se debería a las moléculas de lacasa adecuadamente conectadas a las AuNP con una distancia más óptima para la TED a través del centro T1, y que por tanto tiene lugar al potencial redox del Cu T1. La otra población correspondería a las moléculas de lacasa inmovilizadas donde la distancia entre el electrodo y el centro de Cu T1 es mayor que la óptima, lo que produce que el proceso catalítico esté limitado cinéticamente por la TED, y en consecuencia la corriente catalítica aumenta con el sobrepotencial (Léger, C.y col., 2008).

Cuando la densidad de corriente catalítica medida en el electrodo es menor se manifiestan más claramente las dos pendientes electrocatalíticas,

incluso se obtiene un plató entre ambas (Figura 5.3.9). Este resultado sugiere que la población de lacasa que presenta reducción bioelectrocatalítica a altos potenciales sea aquella que se inmovilizó sobre AuNP, confirmando que el empleo de AuNP facilita la TED entre la lacasa y el electrodo modificado (Dagys, M. y col., 2010). En cambio, el segundo proceso electrocatalítico que se mide a potenciales menores puede ser debido a aquella población de lacasa que se inmovilizó directamente sobre el electrodo LDG funcionalizado.

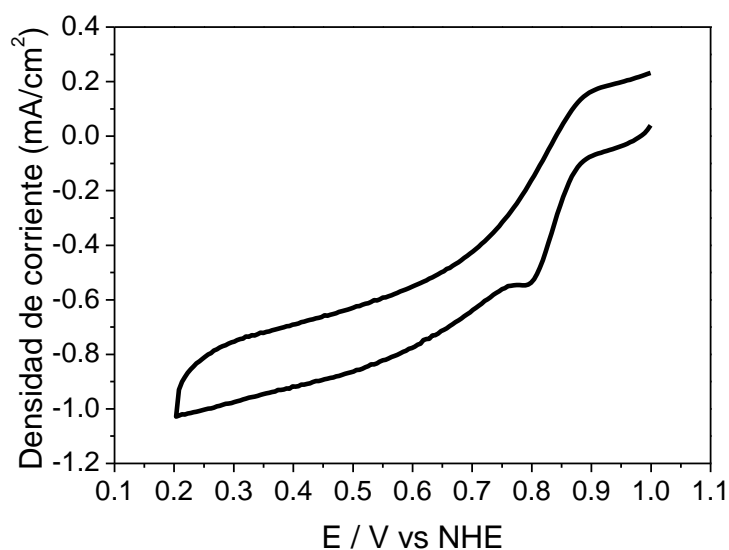


Figura 5.3.9. Respuesta bioelectrocatalítica de un electrodo LDG-AuNP (3 días) con lacasa inmovilizada en dos etapas y rotando el electrodo a 500 rpm. La medida de voltamperometría cíclica se realizó en tampón acetato 50 mM, NaClO₄ 100 mM, pH 4,2, 27 °C, bajo O₂. La velocidad de barrido fue 10 mV/s.

Se añadió ABTS en la celda de medida, como se muestra en la Figura 5.3.10, para que aquellas enzimas que no presentasen una orientación favorable para la TED fuesen capaces de reducir el O₂ utilizando ABTS como mediador redox.

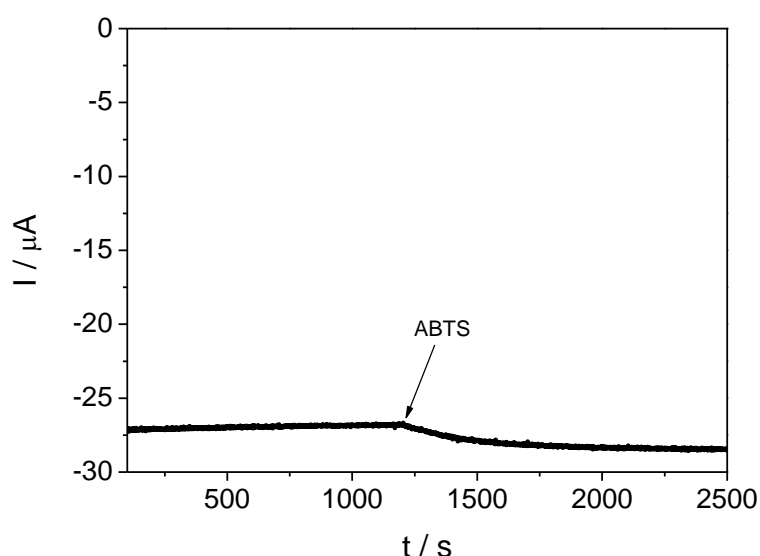


Figura 5.3.10. Efecto de la adición de ABTS 0,2 mM en el tampón de medida sobre un electrodo LDG-AuNP (3 días) inmovilizado con lacasa en dos etapas. La medida se hizo mediante cronoamperometría a 0,4 V vs NHE, rotando el electrodo a 500 rpm, bajo O₂.

La corriente catalítica mediada aumentó solamente un 6 % respecto de la corriente catalítica directa, lo cual indica que hay pocas moléculas de enzima inmovilizadas y activas que no tengan la orientación adecuada para TED. Por lo tanto, mediante esta estrategia de inmovilización se obtiene mayoritariamente una orientación favorable de la lacasa para la obtención de TED entre la enzima y el electrodo LDG-AuNP. De hecho, cuando la inmovilización covalente de la lacasa *Th* se hizo por enlaces amidas al electrodo LDG funcionalizado con grupos 4-aminofenilos en ausencia de AuNP, la corriente catalítica mediada obtenida fue el doble de la directa (Figura 5.1.4).

5.3.2.1. Influencia del diámetro de las AuNP

Se emplearon también AuNP de mayor tamaño, (16 ± 2) nm de diámetro tres veces mayor que las empleadas hasta el momento, de 5 nm (Frens, G., 1973). El motivo era estudiar el efecto que puede producir la diferencia de tamaño de AuNP en la inmovilización de lacasa y en la TED. El tiempo estudiado para la incubación de las AuNP de 16 nm sobre los electrodos LDG

fue desde 3 horas hasta 3 días. Las mayores corrientes catalíticas de reducción de O_2 se consiguieron incubando el electrodo con AuNP durante 3 días, tal y como ocurría con las AuNP de menor tamaño. Se muestran los resultados de las voltamperometrías obtenidas con los electrodos LDG-AuNP (3 días, 16 nm) en la Figura 5.3.11.

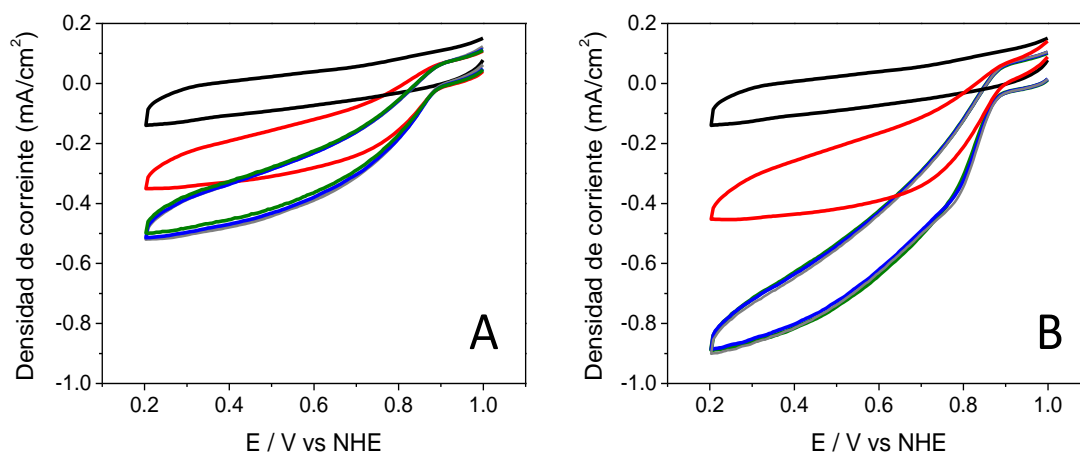


Figura 5.3.11. Reducción bioelectrocatalítica de O_2 medida para un electrodo LDG-AuNP-(16 nm)-(3 días)-lacasa por voltamperometría cíclica. El ciclo de color rojo se realizó a 0 rpm, ciclo verde a 500 rpm, ciclo azul a 1000 rpm, ciclo gris a 1500 rpm y el ciclo de color negro en presencia de F^- 30 mM.

Se midieron los valores de densidades corriente catalítica de reducción de O_2 a 0,4 V y a 0,8 V vs NHE, obteniendo $(-820 \pm 30) \mu A/cm^2$ y $(-360 \pm 10) \mu A/cm^2$ respectivamente. Estos valores son similares a los medidos con los electrodos LDG en ausencia de AuNP (apartado 5.1.1.2). Por lo tanto, el empleo de AuNP de este tamaño no mejora las corrientes catalíticas, ni a bajos ni a altos potenciales. Se observa que la onda catalítica de reducción de O_2 presenta también el doble mecanismo discutido en el apartado 5.3.1.2, pero menos acusado que cuando el tamaño de AuNP era de 5 nm. Esto nos indica que hay lacasa inmovilizada sobre las dos clases de superficies que presenta el electrodo, pero las AuNP de 16 nm no producen un efecto de mejora significativa en la TED.

Esta influencia del tamaño de las AuNP en la catálisis electroenzimática se puede explicar porque se favorece la interacción entre la AuNP y la cavidad próxima al centro T1 de la lacasa cuando su diámetro es menor, y

consecuentemente su curvatura es mayor y aparece un mayor número de aristas en las nanopartículas, que no son esferas, sino octaedros truncados, acelerando la TED con electrodo. Este efecto también se ha descrito para la enzima superóxido dismutasa (El-Deab, M. S. y col., 2007).

5.3.3. Inhibición por haluros

Se investigó la respuesta electrocatalítica que presenta el electrodo LDG-AuNP-lacasa frente a diferentes concentraciones de Cl^- mediante cronoamperometría.

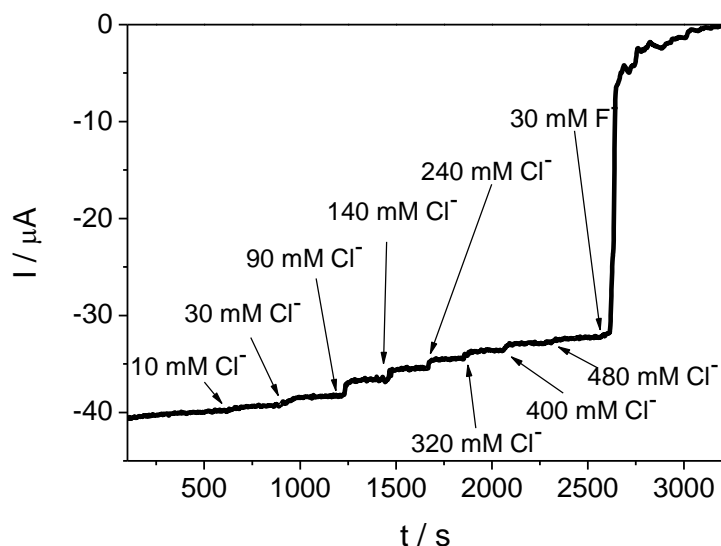


Figura 5.3.12. Efecto de la inhibición por Cl^- en el electrodo LDG-AuNP(5 nm)-lacasa. Cronoamperometría realizada a 0,4 V vs NHE y 500 rpm, en tampón acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM, pH 4,2, 27 °C, bajo 1 atm de O_2 .

La Figura 5.3.12 muestra la respuesta cronoamperométrica del electrodo LDG-AuNP(5 nm) frente a la variación de la concentración de Cl^- . Cuando la concentración de Cl^- en el medio fue de 140 mM, concentración máxima presente en el suero humano, se pierde solo el $(16 \pm 6) \%$, ($n=3$) de la corriente catalítica.

Se realizó el mismo experimento empleando AuNP de mayor tamaño (16 nm). Los resultados se muestran en la Figura 5.3.13.

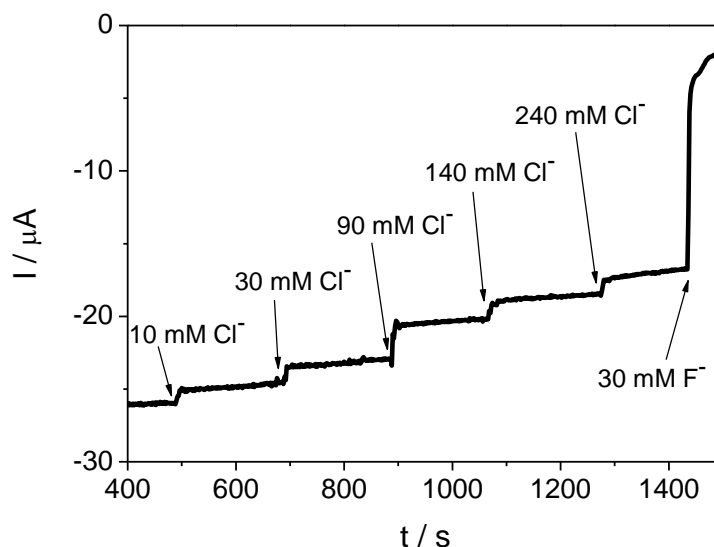


Figura 5.3.13. Efecto de la inhibición por Cl^- en el electrodo LDG-AuNP(16 nm)-lacasa. Cronoamperometría realizada a 0,4 V vs NHE y 500 rpm, en tampón acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM, pH 4,2, 27 °C, bajo 1 atm de O_2 .

La pérdida de corriente catalítica en este caso asciende a $(25 \pm 2) \%$ ($n=5$) cuando hay una concentración de Cl^- en el medio de 140 mM (Figura 5.3.13).

Si se compara la inhibición observada en presencia de 140 mM de Cl^- para los electrodos LDG-AuNP(5 nm)-lacasa con la de los electrodos LDG-lacasa en ausencia de AuNP descritos en el apartado 5.1.1.4, $(17 \pm 5) \%$, se concluye que el efecto es el mismo. Sin embargo, la pérdida de corriente que se obtenía con los electrodos de oro planos (apartado 5.2.3) en las mismas condiciones fue significativamente más elevada, indicando que no solo estaba provocada por la inhibición que causaba el anión a la enzima sino además, porque se absorbía y se oxidaba sobre el electrodo. Extrapolando este razonamiento al resultado obtenido para el electrodo LDG-AuNP(16 nm) se podría concluir que el 10 % de pérdida adicional en la corriente catalítica frente al electrodo LDG-AuNP(5 nm) es debido a que existen regiones de oro en las AuNP más grandes donde la enzima no se ha inmovilizado, dejando espacio para la adsorción de Cl^- directamente sobre la monocapa mixta.

Debido a que las AuNP de 5 nm presentan un tamaño similar a las dimensiones de la lacasa ($65 \times 55 \times 45$) Å³ (Piontek, K.y col., 2002), estarían protegidas por la enzima unida covalentemente y los iones cloruros tendrían

impedido el acceso a las AuNP. Debido a esto, la inhibición por Cl^- en los electrodos LDG-AuNP(5 nm)-lacasa es similar a la que presentan los electrodos LDG-Lacasa.

5.3.4. Estabilidad operacional

Se evaluó la estabilidad que presenta el electrodo LDG-AuNP-lacasa mediante un estudio de cronoamperometría midiendo de manera continua la reducción catalítica de O_2 durante 5 días y rotando el electrodo a 500 rpm. El resultado se comparó con el resultado de estabilidad operacional que se obtuvo para el electrodo LDG sin AuNP modificado con lacasa en dos etapas (apartado 5.1.1.4).

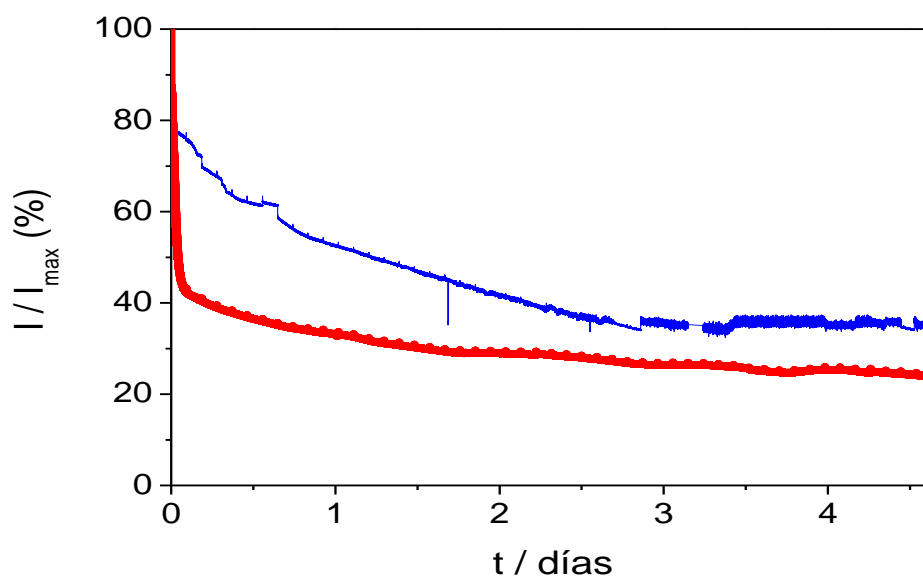


Figura 5.3.14. Cronoamperogramas de reducción de O_2 medidos a 0,4 V vs NHE de un electrodo LDG-AuNP(5 nm) (color azul) y LDG sin AuNP (color rojo). En ambos electrodos se inmovilizó covalentemente lacasa en dos etapas. La medida se realizó en tampón acetato 50 mM, NaClO_4 100 mM, pH 4,2, 27 °C, 1 atm de O_2 , rotando el electrodo a 500 rpm.

Se observa cómo durante el primer día de medida con el electrodo LDG-AuNP-lacasa se pierde casi el 50 % de la corriente mientras que con el electrodo LDG-lacasa la pérdida de corriente asciende al 70 % respecto de la corriente inicial. Se consigue un plató de corriente con el electrodo LDG-AuNP

al tercer día de medida, manteniéndose constante la corriente hasta el quinto día. Se mantiene el 55 % de la corriente inicial después de trabajar durante 5 días de manera continua y con agitación, mejorándose la estabilidad un 32,57 % con el empleo de AuNP (5 nm).

5.3.5. Conclusiones

Se han desarrollado electrodos nanoestructurados de lacasa basados en la combinación de las estrategias optimizadas previamente de modificación controlada a nivel molecular de electrodos de grafito y oro. El mejor resultado se obtuvo modificando covalentemente la estructura porosa de electrodos LDG con AuNP de tamaño similar a la de las moléculas de lacasa. Mediante la estrategia química de formación *in situ* de sales de diazonio en fase heterogénea y su posterior reducción electroquímica se ha podido anclar de forma controlada al electrodo las AuNP y la lacasa en etapas sucesivas. La funcionalización de las AuNP permite orientar adecuadamente la enzima inmovilizada para DET.

Los resultados obtenidos con este tipo de electrodos en la bioelectroreducción de O₂ mejoran los obtenidos en los capítulos previos de inmovilización de lacasa sobre los distintos tipos de electrodos de grafito o de oro. Las AuNP mejoran la transferencia electrónica entre lacasa *Th* y electrodo, actuando por tanto como puentes electrónicos, y permitiendo mayores corrientes catalíticas de reducción de O₂ a potenciales redox cercanos a los del centro T1 de lacasa. Además, la estabilidad operacional mejora la obtenida para los electrodos LDG-lacasa, lo que demuestra la robustez que proporciona al electrodo nanoestructurado la inmovilización de las Au-NP mediante enlaces C_{sp2}-Au y la estabilidad de la lacasa unida covalentemente a las AuNP.

Hasta hace muy poco no se habían reportado en la literatura electrodos híbridos de carbono y AuNP modificados con lacasa. Solo recientemente, Luckarift y cols. han inmovilizado mediante entrecruzamiento, lacasa sobre electrodos de carbono con una suspensión de carbón y AuNP. Sin embargo, las corrientes catalíticas que miden son considerablemente inferiores a las obtenidas en esta tesis, (50-80) $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Su aproximación tampoco permite el

efecto de doble mecanismo de TED obtenido en el proceso bioelectrocatalítico. Estas diferencias se pueden atribuir bien a que no contengan una elevada cantidad de AuNP inmovilizadas, bien porque la lacasa no se une sobre las AuNP sino al carbono o bien porque la unión que realizan entre el enzima y el electrodo no favorece la orientación del centro de cobre T1 hacia el electrodo (Luckarift, H. R. y col., 2012).

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Se han caracterizado los estados redox del centro activo de la hidrogenasa [NiFeSe] de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough por FTIR. Además, se ha estudiado el efecto de inhibición por O₂ y CO en la hidrogenasa. En el caso del CO se ha comprobado que es causada por la coordinación del inhibidor al átomo de Ni del centro activo cuando la enzima está reducida. Dicha inhibición no ocurre cuando la enzima se encuentra en el estado Ni-IS, debido a que el átomo de Ni se encuentra coordinado con un S extra entre el Ni y el Se. El O₂ inhibe la hidrogenasa oxidando la cisteína terminal del centro activo, generando un sulfinato.

Se han desarrollado estrategias de inmovilización para la hidrogenasa [NiFeSe] de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough sobre electrodos de oro modificados con bicapas de fosfolípidos, controlando la orientación de la enzima y manteniendo su conformación más activa. El método de inmovilización en dos etapas da lugar a la inserción de la hidrogenasa mediante su cadena hidrofóbica en la bicapa fosfolipídica soportada sobre el electrodo y con su centro redox orientado hacia la disolución. Esta orientación de la hidrogenasa permite únicamente transferencia electrónica mediada. El método de inmovilización en una sola etapa permite inmovilizar covalentemente hidrogenasa sobre electrodos de oro funcionalizados con su centro redox orientado hacia el electrodo y las cadenas hidrofóbicas insertadas en una bicapa de fosfolípidos generada sobre la monocapa de hidrogenasa. Esta configuración permite transferencia electrónica directa entre la hidrogenasa y el electrodo.

Se ha diseñado una estrategia de inmovilización en dos etapas sobre electrodos de carbono para la lacasa de *Trametes hirsuta*, donde además de favorecer la orientación óptima de la lacasa sobre el electrodo funcionalizado para obtener transferencia electrónica directa, se ha aumentado la estabilidad de la inmovilización de la enzima, manteniendo el 22,43 % de corriente catalítica inicial después de trabajar durante 6 días en continuo. Se ha

demostrado la elevada sensibilidad al O_2 que presenta un electrodo de estas características para su aplicación como biosensor de O_2 .

La inmovilización de la lacasa sobre un electrodo tridimensional basado en microfibras de carbono ramificadas con nanotubos de carbono ha supuesto un aumento significativo en las densidades de corrientes catalíticas para reducción bioelectrocatalítica de O_2 . Se obtuvo una corriente de $-1,5 \text{ mA/cm}^2$ a $0,4 \text{ V vs NHE}$, en condiciones de saturación de O_2 . Este buen resultado es debido al aumento de la superficie electroactiva que presentan los electrodos nanoestructurados, permitiendo un mayor recubrimiento de lacasa por área geométrica del electrodo.

El diseño de una monocapa mixta constituida mediante electrorreducción de sales de diazonio y una monocapa autoensamblada de tioles ha permitido la inmovilización covalente de la lacasa orientada sobre electrodos de oro, generando altas densidades de corriente catalíticas de reducción de O_2 a altos potenciales redox.

La inmovilización de lacasa sobre electrodos nanoestructurados de oro no ha permitido aumentar apenas las densidades de corriente catalíticas obtenidas sobre oro plano. Sin embargo, ha provocado un efecto de mejora en la inhibición frente a iones cloruro, debido a que la enzima se encuentra encajada en la superficie nanoestructurada impidiendo parcialmente el acceso de los iones cloruro al centro T1 la enzima.

Se ha diseñado una estrategia para la construcción de electrodos nanoestructurados basados en la integración de nanopartículas de oro (AuNP) en los poros de electrodos de grafito LDG mediante enlaces covalentes C-Au. Las AuNP inmovilizadas mantienen sus dimensiones iniciales con ausencia de nuevas nucleaciones y obteniendo altos recubrimientos de oro en el electrodo de carbono. El empleo de AuNP de $(5 \pm 3) \text{ nm}$ mejora las propiedades catalíticas de lacasa inmovilizada, facilitando la transferencia electrónica directa entre el centro redox de la lacasa y el electrodo. Este biocátodo, en condiciones de saturación de O_2 , da lugar a corrientes catalíticas de $-1,4 \text{ mA/cm}^2$ a un potencial de $0,4 \text{ V vs NHE}$, y $-0,5 \text{ mA/cm}^2$ a $0,8 \text{ V vs NHE}$. Además, mantiene el 55 % de la corriente catalítica inicial después de operar durante 5 días de

manera continua. Este electrodo nanoestructurado supone un biocátodo de interés para su implementación en bioceldas de combustible.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Abad, J. M., Gass, M., Bleloch, A., and Schiffrin, D. J. (2009), Direct electron transfer to a metalloenzyme redox center coordinated to a monolayer-protected cluster, *J. Am. Chem. Soc.* 131, 10229-10236

Ackermann, Y., Guschin, D. A., Eckhard, K., Shleev, S., and Schuhmann, W. (2010), Design of a bioelectrocatalytic electrode interface for oxygen reduction in biofuel cells based on a specifically adapted Os-complex containing redox polymer with entrapped *Trametes hirsuta* laccase, *Electrochem. Commun.* 12, 640-643

Adenier, A., Cabet-Deliry, E., Chaussé, A., Griveau, S., Mercier, F., Pinson, J., and Vautrin-UI, C. (2005), Grafting of nitrophenyl groups on carbon and metallic surfaces without electrochemical induction, *Chem. Mater.* 17, 491-501

Allongue, P., Delamar, M., Desbat, B., Fagebaume, O., Hitmi, R., Pinson, J., and Savéant, J. M. (1997), Covalent modification of carbon surfaces by aryl radicals generated from the electrochemical reduction of diazonium salts, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 201-207

Alonso-Lomillo, M. A., Rudiger, O., Maroto-Valiente, A., Velez, M., Rodriguez-Ramos, I., Munoz, F. J., Fernandez, V. M., and De Lacey, A. L. (2007), Hydrogenase-coated carbon nanotubes for efficient H₂ oxidation, *Nano Lett.* 7, 1603-1608

Alonso, N., López-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Mateo, C., Guisan, J. M., and Fernandez-Lafuente, R. (2005), Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sephabeads supports by the glutaraldehyde crosslinking method, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 35, 57-61

Arroyo, M. (1998), Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications, *Inmovilizacion de enzimas. Fundamentos, metodos y aplicaciones.* 39, 111-127

Baldrian, P. (2006), Fungal laccases-occurrence and properties, *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 215-242

Barbadillo, M., Casero, E., Petit-Domínguez, M. D., Vázquez, L., Pariente, F., and Lorenzo, E. (2009), Gold nanoparticles-induced enhancement of the analytical response of an electrochemical biosensor based on an organic-inorganic hybrid composite material, *Talanta*. 80, 797-802

Baron, R., Willner, B., and Willner, I. (2007), Biomolecule-nanoparticle hybrids as functional units for nanobiotechnology, *Chem. Commun.* 323-332

Barrett, F. M., and Andersen, S. O. (1981), Phenoloxidases in larval cuticle of the blowfly, *Calliphora vicina*, *Insect Biochemistry*. 11, 17-23

Barton, S. C., Kim, H. H., Binyamin, G., Zhang, Y., and Heller, A. (2001), The "wired" laccase cathode: High current density electroreduction of O₂ to water at +0.7 V (NHE) at pH 5 [1], *J. Am. Chem. Soc.* 123, 5802-5803

Barton, S. C., Pickard, M., Vazquez-Duhalt, R., and Heller, A. (2002), Electroreduction of O₂ to water at 0.6 V (SHE) at pH 7 on the "wired" *Pleurotus ostreatus* laccase cathode, *Biosensors & bioelectronics*. 17, 1071-1074

Barton, S. C., Gallaway, J., and Atanassov, P. (2004), Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices, *Chem Rev.* 104, 4867-4886

Benedetto, A., Balog, M., Viel, P., Le Derf, F., Sallé, M., and Palacin, S. (2008), Electro-reduction of diazonium salts on gold: Why do we observe multi-peaks?, *Electrochim. Acta*. 53, 7117-7122

Berlier, Y., Fauque, G. D., LeGall, J., Choi, E. S., Peck, H. D., Jr., and Lespinat, P. A. (1987), Inhibition studies of three classes of *Desulfovibrio* hydrogenase: application to the further characterization of the multiple hydrogenases found in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, *Biochem Biophys Res Commun.* 146, 147-153

Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Fuentes, M., Podrasky, O., Kuncova, G., Guisán, J. M., and Fernández-Lafuente, R. (2005), Advantages of

the pre-immobilization of enzymes on porous supports for their entrapment in sol-gels, *Biomacromolecules*. 6, 1027-1030

Beyl, Y., Guschin, D. A., Shleev, S., and Schuhmann, W. (2011), A chloride resistant high potential oxygen reducing biocathode based on a fungal laccase incorporated into an optimized Os-complex modified redox hydrogel, *Electrochem. Commun.* 13, 474-476

Blaich, R., and Esser, K. (1975), Function of enzymes in wood destroying fungi. II. Multiple forms of laccase in white rot fungi, *Arch. Microbiol.* 103, 271-277

Blanford, C. F., Heath, R. S., and Armstrong, F. A. (2007), A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O(2) reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface, *Chem Commun (Camb)*. 1710-1712

Brooksby, P. A., and Downard, A. J. (2004), Electrochemical and atomic force microscopy study of carbon surface modification via diazonium reduction in aqueous and acetonitrile solutions, *Langmuir*. 20, 5038-5045

Bryant, M. A., and Crooks, R. M. (1993), Determination of surface pKa values of surface-confined molecules derivatized with pH-sensitive pendant groups, *Langmuir*. 9, 385-387

Cammack, R., Fernandez, V. M., and Hatchikian, E. C. (1994), Nickel-iron hydrogenase, *Methods Enzymol.* 243, 43-68

Christenson, A., Dimcheva, N., Ferapontova, E. E., Gorton, L., Ruzgas, T., Stoica, L., Shleev, S., Yaropolov, A. I., Haltrich, D., Thorneley, R. N. F., and Aust, S. D. (2004), Direct electron transfer between ligninolytic redox enzymes and electrodes, *Electroanalysis*. 16, 1074-1092

Coman, V., Ludwig, R., Harreither, W., Haltrich, D., Gorton, L., Ruzgas, T., and Shleev, S. (2010), A Direct Electron Transfer-Based Glucose/Oxygen Biofuel Cell Operating in Human Serum, *Fuel Cells*. 10, 9-16

Cooper, J. M., Greenough, K. R., and McNeil, C. J. (1993), Direct electron transfer reactions between immobilized cytochrome c and modified gold electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 347, 267-275

Couto, S. R., and Sanromán, M. A. (2006), Application of solid-state fermentation to food industry-A review, *J. Food Eng.* 76, 291-302

Dagys, M., Haberska, K., Shleev, S., Arnebrant, T., Kulys, J., and Ruzgas, T. (2010), Laccase-gold nanoparticle assisted bioelectrocatalytic reduction of oxygen, *Electrochem. Commun.* 12, 933-935

Darensbourg, M. Y., Lyon, E. J., and Smee, J. J. (2000), The bio-organometallic chemistry of active site iron in hydrogenases, *Coord. Chem. Rev.* 206-207, 533-561

De Lacey, A. L., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., Fontecilla-Camps, J. C., and Fernandez, V. M. (1997), Infrared-spectroelectrochemical characterization of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 7181-7189

De Lacey, A. L., Fernández, V. M., and Rousset, M. (2005), Native and mutant nickel-iron hydrogenases: Unravelling structure and function, *Coord. Chem. Rev.* 249, 1596-1608

De Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Rousset, M., and Cammack, R. (2007a), Activation and inactivation of hydrogenase function and the catalytic cycle: spectroelectrochemical studies, *Chem Rev.* 107, 4304-4330

De Lacey AL, Fernandez VM, Rousset M, Cavazza C, Hatchikian EC (2003) *J Biol Inorg Chem* 8:129–134

De Lacey, A. L., Fernández, V. M., Rousset, M., and Cammack, R. (2007b), Activation and inactivation of hydrogenase function and the catalytic cycle: Spectroelectrochemical studies, *Chem. Rev.* 107, 4304-4330

Delamar, M., Hitmi, R., Pinson, J., and Savéant, J. M. (1992), Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts, *J. Am. Chem. Soc.* 114, 5883-5884

- Domínguez-Renedo, O., Alonso-Lomillo, M. A., Recio-Cebrián, P., and Arcos-Martínez, M. J. (2012), Screen-printed acetylcholinesterase-based biosensors for inhibitive determination of permethrin, *Sci. Total Environ.* 426, 346-350
- Downard, A. J. (2000), Electrochemically assisted covalent modification of carbon electrodes, *Electroanalysis*. 12, 1085-1096
- Downard, A. J., and Prince, M. J. (2001), Barrier properties of organic monolayers on glassy carbon electrodes, *Langmuir*. 17, 5581-5586
- Duff, D. G., Baiker, A., and Edwards, P. P. (1993), A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle size variation, *Langmuir*. 9, 2301-2309
- Edwards, T. R. G., Cunnane, V. J., Parsons, R., and Gani, D. (1989), Construction of a stable flavin-gold electrode displaying very fast electron transfer kinetics, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1041-1043
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F., and Eriksson, K. E. (1995), Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid, *FEBS Lett.* 376, 202-206
- Eggert, C., LaFayette, P. R., Temp, U., Eriksson, K. E., and Dean, J. F. (1998), Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*, *Appl Environ Microbiol.* 64, 1766-1772
- Eidsness, M. K., Scott, R. A., Prickril, B. C., DerVartanian, D. V., Legall, J., Moura, I., Moura, J. J., and Peck, H. D., Jr. (1989), Evidence for selenocysteine coordination to the active site nickel in the [NiFeSe]hydrogenases from *Desulfovibrio baculatus*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 147-151
- El-Deab, M. S., and Ohsaka, T. (2007), Direct electron transfer of copper–zinc superoxide dismutase (SOD) on crystallographically oriented Au nanoparticles, *Electrochem. Commun.* 9, 651-656
- Enguita, F. J., Martins, L. O., Henriques, A. O., and Carrondo, M. A. (2003), Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties, *The Journal of biological chemistry.* 278, 19416-19425

Fauque, G. D., Berlier, Y. M., and Czechowski, M. H. (1987), A proton-deuterium exchange study of three types of Desulfovibrio hydrogenases, *J. Ind. Microbiol.* 2, 15-23

Feng, W., and Ji, P. (2011), Enzymes immobilized on carbon nanotubes, *Biotechnol. Adv.* 29, 889-895

Fontecilla-Camps, J. C., Volbeda, A., Cavazza, C., and Nicolet, Y. (2007), Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases, *Chem Rev.* 107, 4273-4303

Frasconi, M., Boer, H., Koivula, A., and Mazzei, F. (2010), Electrochemical evaluation of electron transfer kinetics of high and low redox potential laccases on gold electrode surface, *Electrochim. Acta.* 56, 817-827

Freeman, H. S., Whaley, W. M., Esancy, M. K., and Esancy, J. F. (1986), Anomalous behavior of aminohydroxynaphthalenesulfonic acids during diazo coupling, *Dyes and Pigments.* 7, 215-230

Frens, G. (1973), An experiment concerning the dispersion forces between very small metal spheres, *Phys. Lett. A.* 44, 208-210

Galhaup, C., and Haltrich, D. (2001), Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 225-232

Garavaglia, S., Cambria, M. T., Miglio, M., Ragusa, S., Iacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., and Rizzi, M. (2004), The structure of *Rigidoporus lignosus* Laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair, *J Mol Biol.* 342, 1519-1531

Garcia-Manyes, S., Gorostiza, P., and Sanz, F. (2006), Titration force microscopy on supported lipid bilayers, *Anal Chem.* 78, 61-70

García, T., Revenga-Parra, M., Añorga, L., S.arana, Pariente, F., and Lorenzo, E. (2012), Disposable DNA biosensor based on thin-film gold electrodes for selective Salmonella detection, *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 161, 1030-1037

Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1999), The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center, *Structure*. 7, 557-566

Gellett, W., Kesmez, M., Schumacher, J., Akers, N., and Minteer, S. D. (2010), Biofuel cells for portable power, *Electroanalysis*. 22, 727-731

Ghazi, I., Gómez De Segura, A., Fernández-Arrojo, L., Alcalde, M., Yates, M., Rojas-Cervantes, M. L., Plou, F. J., and Ballesteros, A. (2005), Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides, *J. Mol. Catal. B: Enzym*. 35, 19-27

Girguis, P. R., Nielsen, M. E., and Figueroa, I. (2010), Harnessing energy from marine productivity using bioelectrochemical systems, *Curr Opin Biotechnol*. 21, 252-258

Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M. L., and Bally, R. (1993), Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*, *FEMS Microbiol. Lett*. 108, 205-210

González Arzola, K., Gimeno, Y., Arévalo, M. C., Falcón, M. A., and Hernández Creus, A. (2010), Electrochemical and AFM characterization on gold and carbon electrodes of a high redox potential laccase from *Fusarium proliferatum*, *Bioelectrochemistry*. 79, 17-24

Gooding, J. J., Mearns, F., Yang, W., and Liu, J. (2003), Self-assembled monolayers into the 21st century: Recent advances and applications, *Electroanalysis*. 15, 81-96

Grazú, V., López-Gallego, F., Montes, T., Abian, O., González, R., Hermoso, J. A., García, J. L., Mateo, C., and Guisán, J. M. (2010), Promotion of multipoint

covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*, *Process Biochem.* 45, 390-398

Gupta, G., Rajendran, V., and Atanassov, P. (2004), Bioelectrocatalysis of oxygen reduction reaction by laccase on gold electrodes, *Electroanalysis*. 16, 1182-1185

Gutiérrez-Sánchez, C., Jia, W., Beyl, Y., Pita, M., Schuhmann, W., De Lacey, A. L., and Stoica, L. (2012), Enhanced direct electron transfer between laccase and hierarchical carbon microfibers/carbon nanotubes composite electrodes. Comparison of three enzyme immobilization methods, *Electrochim. Acta*.

Hakamada, M., Takahashi, M., and Mabuchi, M. (2012), Enhanced thermal stability of laccase immobilized on monolayer-modified nanoporous Au, *Mater. Lett.* 66, 4-6

Harper, J. C., Polsky, R., Wheeler, D. R., Lopez, D. M., Arango, D. C., and Brozik, S. M. (2009), A multifunctional thin film Au electrode surface formed by consecutive electrochemical reduction of aryl diazonium salts, *Langmuir*. 25, 3282-3288

He, S. H., Teixeira, M., LeGall, J., Patil, D. S., Moura, I., Moura, J. J., DerVartanian, D. V., Huynh, B. H., and Peck Jr, H. D. (1989), EPR studies with ⁷⁷Se-enriched (NiFeSe) hydrogenase of *Desulfovibrio baculatus*. Evidence for a selenium ligand to the active site nickel, *J. Biol. Chem.* 264, 2678-2682

Heller, A. (2005), Integrated medical feedback systems for drug delivery, *AIChE J.* 51, 1054-1066

Heller, A. (2006), Potentially implantable miniature batteries, *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 469-473

Hezard, T., Fajerweg, K., Evrard, D., Collire, V., Behra, P., and Gros, P. (2012), Gold nanoparticles electrodeposited on glassy carbon using cyclic voltammetry: Application to Hg(II) trace analysis, *J. Electroanal. Chem.* 664, 46-52

Hoare, J. P. (1984), CYCLIC VOLTAMMETRIC STUDY OF THE GOLD-OXYGEN SYSTEM, *J. Electrochem. Soc.* 131, 1808-1815

Hoeben, F. J. M., Heller, I., Albracht, S. P. J., Dekker, C., Lemay, S. G., and Heering, H. A. (2008), Polymyxin-coated Au and carbon nanotube electrodes for stable [NiFe]-hydrogenase film voltammetry, *Langmuir*. 24, 5925-5931

Holzinger, M., Le Goff, A., and Cosnier, S. (2012), Carbon nanotube/enzyme biofuel cells, *Electrochim. Acta*.

Ihs, A., and Liedberg, B. (1994), Infrared study of ethyl and octyl xanthate ions adsorbed on metallic and sulfidized copper and silver surfaces, *Langmuir*. 10, 734-740

Jirkovský, J. S., Halasa, M., and Schiffrin, D. J. (2010), Kinetics of electrocatalytic reduction of oxygen and hydrogen peroxide on dispersed gold nanoparticles, *PCCP*. 12, 8042-8052

Jones, A. K., Sillery, E., Albracht, S. P., and Armstrong, F. A. (2002), Direct comparison of the electrocatalytic oxidation of hydrogen by an enzyme and a platinum catalyst, *Chem Commun (Camb)*. 866-867

Jones, A. K., Lamle, S. E., Pershad, H. R., Vincent, K. A., Albracht, S. P., and Armstrong, F. A. (2003), Enzyme electrokinetics: electrochemical studies of the anaerobic interconversions between active and inactive states of *Allochromatium vinosum* [NiFe]-hydrogenase, *J Am Chem Soc.* 125, 8505-8514

Kamitaka, Y., Tsujimura, S., Setoyama, N., Kajino, T., and Kano, K. (2007), Fructose/dioxygen biofuel cell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis, *Physical chemistry chemical physics : PCCP*. 9, 1793-1801

Karnicka, K., Miecznikowski, K., Kowalewska, B., Skunik, M., Opallo, M., Rogalski, J., Schuhmann, W., and Kulesza, P. J. (2008), ABTS-modified multiwalled carbon nanotubes as an effective mediating system for bioelectrocatalytic reduction of oxygen, *Anal Chem.* 80, 7643-7648

Katz, E., and Willner, I. (2004), Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: Applications in nanobioelectronics, *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*. 5, 1084-1104

Kojima, Y., Tsukuda, Y., Kawai, Y., Tsukamoto, A., Sugiura, J., Sakaino, M., and Kita, Y. (1990), Cloning, sequence analysis, and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*, *J. Biol. Chem.* 265, 15224-15230

Koroleva, O. V., Stepanova, E. V., Binukov, V. I., Timofeev, V. P., and Pfeil, W. (2001), Temperature-induced changes in copper centers and protein conformation of two fungal laccases from *Coriolus hirsutus* and *Coriolus zonatus*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1547, 397-407

Kullapere, M., Kozlova, J., Matisen, L., Sammelselg, V., Menezes, H. A., Maia, G., Schiffrin, D. J., and Tammeveski, K. (2010), Electrochemical properties of aryl-modified gold electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 641, 90-98

Laibinis, P. E., and Whitesides, G. M. (1992), ω -Terminated alkanethiolate monolayers on surfaces of copper, silver, and gold have similar wettabilities, *J. Am. Chem. Soc.* 114, 1990-1995

Laurentius, L., Stoyanov, S. R., Gusarov, S., Kovalenko, A., Du, R., Lopinski, G. P., and McDermott, M. T. (2011), Diazonium-derived aryl films on gold nanoparticles: Evidence for a carbon-gold covalent bond, *ACS Nano*. 5, 4219-4227

LeGall J, Payne WJ, Chen L, Liu MY, Xavier AV. *Biochimie* 76: 655–665, 1994

Léger, C., and Bertrand, P. (2008), Direct electrochemistry of redox enzymes as a tool for mechanistic studies, *Chem. Rev.* 108, 2379-2438

Lei, J., Fan, J., Yu, C., Zhang, L., Jiang, S., Tu, B., and Zhao, D. (2004), Immobilization of enzymes in mesoporous materials: Controlling the entrance to nanospace, *Microporous Mesoporous Mater.* 73, 121-128

Li, L., Wang, S., Yang, T., Huang, S., and Wang, J. (2012), Electrochemical growth of gold nanoparticles on horizontally aligned carbon nanotubes: A new platform for ultrasensitive DNA sensing, *Biosensors Bioelectron.* 33, 279-283

Li, N., Chen, X., Stoica, L., Xia, W., Qian, J., Aßmann, J., Schuhmann, W., and Muhler, M. (2007), The catalytic synthesis of three-dimensional hierarchical carbon nanotube composites with high electrical conductivity based on electrochemical iron deposition, *Adv. Mater.* 19, 2957-2960

Liu, G., Böcking, T., and Gooding, J. J. (2007), Diazonium salts: Stable monolayers on gold electrodes for sensing applications, *J. Electroanal. Chem.* 600, 335-344

López-Gallego, F., Betancor, L., Mateo, C., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Guisán, J. M., and Fernández-Lafuente, R. (2005), Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports, *J. Biotechnol.* 119, 70-75

Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G., and Whitesides, G. M. (2005), Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chem Rev.* 105, 1103-1169

Lovley, D. R. (2011), Live wires: Direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination, *Energy and Environmental Science.* 4, 4896-4906

Luckarift, H. R., Ivnitski, D. M., Lau, C., Khripin, C., Atanassov, P., and Johnson, G. R. (2012), Gold-Decorated Carbon Composite Electrodes for Enzymatic Oxygen Reduction, *Electroanalysis.* 24, 931-937

Lyashenko, A. V., Bento, I., Zaitsev, V. N., Zhukhlistova, N. E., Zhukova, Y. N., Gabdoulkhakov, A. G., Morgunova, E. Y., Voelter, W., Kachalova, G. S., Stepanova, E. V., Koroleva, O. V., Lamzin, V. S., Tishkov, V. I., Betzel, C., Lindley, P. F., and Mikhailov, A. M. (2006a), X-ray structural studies of the fungal laccase from *Cerrena maxima*, *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry.* 11, 963-973

Lyashenko, A. V., Zhukhlistova, N. E., Gabdoulkhakov, A. G., Zhukova, Y. N., Voelter, W., Zaitsev, V. N., Bento, I., Stepanova, E. V., Kachalova, G. S., Koroleva, O. V., Cherkashyn, E. A., Tishkov, V. I., Lamzin, V. S., Schirwitz, K., Morgunova, E. Y., Betzel, C., Lindley, P. F., and Mikhailov, A. M. (2006b), Purification, crystallization and preliminary X-ray study of the fungal laccase from *Cerrena maxima*, *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*. 62, 954-957

Lyskawa, J., and Bélanger, D. (2006), Direct modification of a gold electrode with aminophenyl groups by electrochemical reduction of in situ generated aminophenyl monodiazonium cations, *Chem. Mater.* 18, 4755-4763

Malkin, R., Malmstrom, B. G., and Vanngard, T. (1969), The reversible removal of one specific copper(II) from fungal laccase, *European journal of biochemistry / FEBS*. 7, 253-259

Malmstrom, B. G. (1982), Enzymology of oxygen, *Annu Rev Biochem.* 51, 21-59

Marcus, R. A., and Sutin, N. (1985), Electron transfers in chemistry and biology, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Bioenergetics*. 811, 265-322

Marques, M. C., Coelho, R., De Lacey, A. L., Pereira, I. A., and Matias, P. M. (2010), The three-dimensional structure of [NiFeSe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: a hydrogenase without a bridging ligand in the active site in its oxidised, "as-isolated" state, *J Mol Biol.* 396, 893-907

McCreery, R. L. (2008), Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry, *Chem. Rev.* 108, 2646-2687

Mirkhalaf, F., and Schiffrin, D. J. (2010), Electrocatalytic oxygen reduction on functionalized gold nanoparticles incorporated in a hydrophobic environment, *Langmuir*. 26, 14995-15001

Miyake, T., Yoshino, S., Yamada, T., Hata, K., and Nishizawa, M. (2011), Self-regulating enzyme-nanotube ensemble films and their application as flexible electrodes for biofuel cells, *J Am Chem Soc.* 133, 5129-5134

- Moehlenbrock, M. J., Toby, T. K., Waheed, A., and Minteer, S. D. (2010), Metabolon catalyzed pyruvate/air biofuel cell, *J. Am. Chem. Soc.* 132, 6288-6289
- Montet, Y., Amara, P., Volbeda, A., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Field, M. J., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1997), Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics, *Nat Struct Biol.* 4, 523-526
- Morelli, X., Czjzek, M., Hatchikian, C. E., Bornet, O., Fontecilla-Camps, J. C., Palma, N. P., Moura, J. J., and Guerlesquin, F. (2000), Structural model of the Fe-hydrogenase/cytochrome c₅₅₃ complex combining transverse relaxation-optimized spectroscopy experiments and soft docking calculations, *The Journal of biological chemistry.* 275, 23204-23210
- Moreno-Guzmán, M., Ojeda, I., Villalonga, R., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., and Pingarrón, J. M. (2012), Ultrasensitive detection of adrenocorticotropin hormone (ACTH) using disposable phenylboronic-modified electrochemical immunosensors, *Biosensors Bioelectron.* 35, 82-86
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., and Yaropolov, A. I. (2007), "Blue" laccases, *Biochemistry (Moscow).* 72, 1136-1150
- Moss, D., Nabadryk, E., Breton, J., and Mantele, W. (1990), Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared spectroscopy and protein electrochemistry. Evaluation of the technique with cytochrome c, *Eur. J. Biochem.* 187, 565-572
- Murata, K., Kajiya, K., Nukaga, M., Suga, Y., Watanabe, T., Nakamura, N., and Ohno, H. (2010), A simple fabrication method for three-dimensional gold nanoparticle electrodes and their application to the study of the direct electrochemistry of cytochrome c, *Electroanalysis.* 22, 185-190
- Nakamoto K (1997) Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, part A. Wiley, New York, pp 126–148
- Nakamura, C., Mizutani, W., Lantz, M. A., Noda, K., Zorin, N. A., and Miyake, J. (1998), Tunneling spectroscopic study of hydrogenase Langmuir-Blodgett film, *Supramol. Sci.* 5, 639-642

Naruse, J., Hoa le, Q., Sugano, Y., Ikeuchi, T., Yoshikawa, H., Saito, M., and Tamiya, E. (2011), Development of biofuel cells based on gold nanoparticle decorated multi-walled carbon nanotubes, *Biosensors & bioelectronics*. 30, 204-210

Nogala, W., Rozniecka, E., Zawisza, I., Rogalski, J., and Opallo, M. (2006), Immobilization of ABTS - laccase system in silicate based electrode for bioelectrocatalytic reduction of dioxygen, *Electrochem. Commun.* 8, 1850-1854

Oesch, U., and Janata, J. (1983), Electrochemical study of gold electrodes with anodic oxide films-I. Formation and reduction behaviour of anodic oxides on gold, *Electrochim. Acta*. 28, 1237-1246

Okura, I., Nakamura, K., and Nakamura, S. (1981), Kinetics of methyl viologen reduction by hydrogen catalyzed by hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris*, *J Inorg Biochem*. 14, 155-161

Ortiz, B., Saby, C., Champagne, G. Y., and Bélanger, D. (1998), Electrochemical modification of a carbon electrode using aromatic diazonium salts. 2. Electrochemistry of 4-nitrophenyl modified glassy carbon electrodes in aqueous media, *J. Electroanal. Chem.* 455, 75-81

Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., and Dutton, P. L. (1999), Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction, *Nature*. 402, 47-52

Palmer, A. E., Lee, S. K., and Solomon, E. I. (2001), Decay of the peroxide intermediate in laccase: reductive cleavage of the O-O bond, *J Am Chem Soc*. 123, 6591-6599

Pang, H. L., Liu, J., Hu, D., Zhang, X. H., and Chen, J. H. (2010), Immobilization of laccase onto 1-aminopyrene functionalized carbon nanotubes and their electrocatalytic activity for oxygen reduction, *Electrochim. Acta*. 55, 6611-6616

Parkin, A., Goldet, G., Cavazza, C., Fontecilla-Camps, J. C., and Armstrong, F. A. (2008), The difference a Se makes? Oxygen-tolerant hydrogen production by the [NiFeSe]-hydrogenase from *Desulfomicrobium baculatum*, *J Am Chem Soc*. 130, 13410-13416

Peck Jr, H. D., and Gest, H. (1956), A new procedure for assay of bacterial hydrogenases, *J. Bacteriol.* 71, 70-80

Pereira, I. A. C., Romão, C. V., Xavier, A. V., LeGall, J., and Teixeira, M. (1998), Electron transfer between hydrogenases and mono- and multiheme cytochromes in *Desulfovibrio* ssp, *J. Biol. Inorg. Chem.* 3, 494-498

Pershad, H. R., Duff, J. L., Heering, H. A., Duin, E. C., Albracht, S. P., and Armstrong, F. A. (1999), Catalytic electron transport in *Chromatium vinosum* [NiFe]-hydrogenase: application of voltammetry in detecting redox-active centers and establishing that hydrogen oxidation is very fast even at potentials close to the reversible H^+/H_2 value, *Biochemistry.* 38, 8992-8999

Pinson, J., and Podvorica, F. (2005), Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts, *Chem Soc Rev.* 34, 429-439

Piontek, K., Antorini, M., and Choinowski, T. (2002), Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers, *The Journal of biological chemistry.* 277, 37663-37669

Pita, M., Shleev, S., Ruzgas, T., Fernández, V. M., Yaropolov, A. I., and Gorton, L. (2006), Direct heterogeneous electron transfer reactions of fungal laccases at bare and thiol-modified gold electrodes, *Electrochem. Commun.* 8, 747-753

Podvorica, F. I., Kanoufi, F., Pinson, J., and Combella, C. (2009), Spontaneous grafting of diazoates on metals, *Electrochim. Acta.* 54, 2164-2170

Polyakov, K. M., Fedorova, T. V., Stepanova, E. V., Cherkashin, E. A., Kurzeev, S. A., Strokopytov, B. V., Lamzin, V. S., and Koroleva, O. V. (2009), Structure of native laccase from *Trametes hirsuta* at 1.8 Å resolution, *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography.* 65, 611-617

Qiu, H., Xu, C., Huang, X., Ding, Y., Qu, Y., and Gao, P. (2008), Adsorption of laccase on the surface of nanoporous gold and the direct electron transfer between them, *Journal of Physical Chemistry C.* 112, 14781-14785

- Quintanar, L., Yoon, J., Aznar, C. P., Palmer, A. E., Andersson, K. K., Britt, R. D., and Solomon, E. I. (2005), Spectroscopic and electronic structure studies of the trinuclear Cu cluster active site of the multicopper oxidase laccase: nature of its coordination unsaturation, *J Am Chem Soc.* 127, 13832-13845
- Quist, A. P., Chand, A., Ramachandran, S., Daraio, C., Jin, S., and Lal, R. (2007), Atomic force microscopy imaging and electrical recording of lipid bilayers supported over microfabricated silicon chip nanopores: lab-on-a-chip system for lipid membranes and ion channels, *Langmuir.* 23, 1375-1380
- Rabaey, K., and Rozendal, R. A. (2010), Microbial electrosynthesis - revisiting the electrical route for microbial production, *Nature reviews. Microbiology.* 8, 706-716
- Ramasamy, R. P., Luckarift, H. R., Ivnitski, D. M., Atanassov, P. B., and Johnson, G. R. (2010), High electrocatalytic activity of tethered multicopper oxidase-carbon nanotube conjugates, *Chem Commun (Camb).* 46, 6045-6047
- Reinhammar, B. R., and Vanngard, T. I. (1971), The electron-accepting sites in *Rhus vernicifera* laccase as studied by anaerobic oxidation-reduction titrations, *European journal of biochemistry / FEBS.* 18, 463-468
- Reinhammar, B. R. M. (1972), Oxidation-reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin, *BBA - Bioenergetics.* 275, 245-259
- Rengaraj, S., Kavanagh, P., and Leech, D. (2011), A comparison of redox polymer and enzyme co-immobilization on carbon electrodes to provide membrane-less glucose/O₂ enzymatic fuel cells with improved power output and stability, *Biosensors & bioelectronics.* 30, 294-299
- Ressine, A., Vaz-Dominguez, C., Fernandez, V. M., De Lacey, A. L., Laurell, T., Ruzgas, T., and Shleev, S. (2010), Bioelectrochemical studies of azurin and laccase confined in three-dimensional chips based on gold-modified nano-/microstructured silicon, *Biosensors & bioelectronics.* 25, 1001-1007
- Rousset, M., Montet, Y., Guigliarelli, B., Forget, N., Asso, M., Bertrand, P., Fontecilla-Camps, J. C., and Hatchikian, E. C. (1998), [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 11625-11630

Rudiger, O., Abad, J. M., Hatchikian, E. C., Fernandez, V. M., and De Lacey, A. L. (2005), Oriented immobilization of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase onto carbon electrodes by covalent bonds for nonmediated oxidation of H₂, *J Am Chem Soc.* 127, 16008-16009

Rüdiger, O., Gutiérrez-Sánchez, C., Olea, D., Pereira, I. A. C., Vélez, M., Fernández, V. M., and de Lacey, A. L. (2010), Enzymatic anodes for hydrogen fuel cells based on covalent attachment of Ni-Fe hydrogenases and direct electron transfer to SAM-modified gold electrodes, *Electroanalysis.* 22, 776-783

Sanlloriente-Méndez, S., Domínguez-Renedo, O., and Arcos-Martínez, M. J. (2012), Development of acid phosphatase based amperometric biosensors for the inhibitive determination of As(V), *Talanta.* 93, 301-306

Scanlon, M. D., Salaj-Kosla, U., Belochapkin, S., MacAodha, D., Leech, D., Ding, Y., and Magner, E. (2012), Characterization of nanoporous gold electrodes for bioelectrochemical applications, *Langmuir.* 28, 2251-2261

Serafín, V., Úbeda, N., Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P., and Pingarrón, J. M. (2012), Ultrasensitive determination of human growth hormone (hGH) with a disposable electrochemical magneto-immunosensor, *Anal. Bioanal. Chem.* 1-8

Shewchuk, D. M., and McDermott, M. T. (2009), Comparison of diazonium salt derived and thiol derived nitrobenzene layers on gold, *Langmuir.* 25, 4556-4563

Shimazu, K., Yagi, I., Sato, Y., and Uosaki, K. (1994), Electrochemical quartz crystal microbalance studies of self-assembled monolayers of 11-ferrocenyl-1-undecanethiol: Structure-dependent ion-pairing and solvent uptake, *J. Electroanal. Chem.* 372, 117-124

Shleev, S., Jarosz-Wilkolazka, A., Khalunina, A., Morozova, O., Yaropolov, A., Ruzgas, T., and Gorton, L. (2005a), Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes, *Bioelectrochemistry.* 67, 115-124

Shleev, S., Tkac, J., Christenson, A., Ruzgas, T., Yaropolov, A. I., Whittaker, J. W., and Gorton, L. (2005b), Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes, *Biosensors & bioelectronics*. 20, 2517-2554

Shleev, S., Pita, M., Yaropolov, A. I., Ruzgas, T., and Gorton, L. (2006a), Direct heterogeneous electron transfer reactions of *Trametes hirsuta* laccase at bare and thiol-modified gold electrodes, *Electroanalysis*. 18, 1901-1908

Shleev, S., Reimann, C. T., Serezhenkov, V., Burbaev, D., Yaropolov, A. I., Gorton, L., and Ruzgas, T. (2006b), Autoreduction and aggregation of fungal laccase in solution phase: possible correlation with a resting form of laccase, *Biochimie*. 88, 1275-1285

Shleev, S. V., Morozova, O. V., Nikitina, O. V., Gorshina, E. S., Rusinova, T. V., Serezhenkov, V. A., Burbaev, D. S., Gazaryan, I. G., and Yaropolov, A. I. (2004), Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes, *Biochimie*. 86, 693-703

Solomon, E. I., Baldwin, M. J., and Lowery, M. D. (1992), Electronic structures of active sites in copper proteins: Contributions to reactivity, *Chem. Rev.* 92, 521-542

Solomon, E. I., Tuzcek, F., Root, D. E., and Brown, C. A. (1994), Spectroscopy of binuclear dioxygen complexes, *Chem. Rev.* 94, 827-856

Solomon, E. I., Sundaram, U. M., and Machonkin, T. E. (1996), Multicopper Oxidases and Oxygenases, *Chem Rev.* 96, 2563-2606

Sorgenfrei, O., Duin, E. C., Klein, A., and Albracht, S. P. (1996), Interactions of ⁷⁷Se and ¹³CO with nickel in the active site of active F420-nonreducing hydrogenase from *Methanococcus voltae*, *The Journal of biological chemistry*. 271, 23799-23806

Sosna, M., Chretien, J. M., Kilburn, J. D., and Bartlett, P. N. (2010), Monolayer anthracene and anthraquinone modified electrodes as platforms for *Trametes hirsuta* laccase immobilisation, *Physical chemistry chemical physics : PCCP*. 12, 10018-10026

Stoica, L., Dimcheva, N., Haltrich, D., Ruzgas, T., and Gorton, L. (2005), Electrochemical investigation of cellobiose dehydrogenase from new fungal sources on Au electrodes, *Biosensors & bioelectronics*. 20, 2010-2018

Stratmann, M. (1990), Chemically modified metal surfaces - A new class of composite materials, *Adv. Mater.* 2, 191-195

Thorum, M. S., Anderson, C. A., Hatch, J. J., Campbell, A. S., Marshall, N. M., Zimmerman, S. C., Lu, Y., and Gewirth, A. A. (2010), Direct, electrocatalytic oxygen reduction by laccase on anthracene-2-methanethiol-modified gold, *Journal of Physical Chemistry Letters*. 1, 2251-2254

Torres-Salas, P., del Monte-Martinez, A., Cutino-Avila, B., Rodriguez-Colinas, B., Alcalde, M., Ballesteros, A. O., and Plou, F. J. (2011), Immobilized biocatalysts: novel approaches and tools for binding enzymes to supports, *Adv Mater.* 23, 5275-5282

Troughton, E. B., Bain, C. D., Whitesides, G. M., Nuzzo, R. G., Allara, D. L., and Porter, M. D. (1988), Monolayer films prepared by the spontaneous self-assembly of symmetrical and unsymmetrical dialkyl sulfides from solution onto gold substrates: Structure, properties, and reactivity of constituent functional groups, *Langmuir*. 4, 365-385

Valente, F., Oliveira, A., Gnadt, N., Pacheco, I., Coelho, A., Xavier, A., Teixeira, M., Soares, C., and Pereira, I. (2005), Hydrogenases in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: structural and physiologic characterisation of the membrane-bound [NiFeSe] hydrogenase, *J. Biol. Inorg. Chem.* 10, 667-682

Valente, F. M., Pereira, P. M., Venceslau, S. S., Regalla, M., Coelho, A. V., and Pereira, I. A. (2007), The [NiFeSe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough is a bacterial lipoprotein lacking a typical lipoprotein signal peptide, *FEBS Lett.* 581, 3341-3344

Vaz-Dominguez, C., Campuzano, S., Rudiger, O., Pita, M., Gorbacheva, M., Shleev, S., Fernandez, V. M., and De Lacey, A. L. (2008), Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O₂ to H₂O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition, *Biosensors & bioelectronics*. 24, 531-537

- Vignais, P. M., Cournac, L., Hatchikian, E. C., Elsen, S., Serebryakova, L., Zorin, N., and Dimon, B. (2002), Continuous monitoring of the activation and activity of [NiFe]-hydrogenases by membrane-inlet mass spectrometry, *Int. J. Hydrogen Energy*. 27, 1441-1448
- Vignais, P. M. (2005), H/D exchange reactions and mechanistic aspects of the hydrogenases, *Coord. Chem. Rev.* 249, 1677-1690
- Vincent, K. A., Cracknell, J. A., Lenz, O., Zebger, I., Friedrich, B., and Armstrong, F. A. (2005a), Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102, 16951-16954
- Vincent, K. A., Parkin, A., Lenz, O., Albracht, S. P. J., Fontecilla-Camps, J. C., Cammack, R., Friedrich, B., and Armstrong, F. A. (2005b), Electrochemical definitions of O₂ sensitivity and oxidative inactivation in hydrogenases, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 18179-18189
- Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J. C., and Frey, M. (1996), Novel metal sites in protein structures, *Curr Opin Struct Biol.* 6, 804-812
- Walczak, M. M., Popenoe, D. D., Deinhammer, R. S., Lamp, B. D., Chung, C., and Porter, M. D. (1991), Reductive desorption of alkanethiolate monolayers at gold: A measure of surface coverage, *Langmuir*. 7, 2687-2693
- Wang, C. P., Franco, R., Moura, J. J., Moura, I., and Day, E. P. (1992), The nickel site in active *Desulfovibrio baculatus* [NiFeSe] hydrogenase is diamagnetic. Multifield saturation magnetization measurement of the spin state of Ni(II), *The Journal of biological chemistry*. 267, 7378-7380
- Wang, X., Shindel, M. M., Wang, S. W., and Ragan, R. (2010), A facile approach for assembling lipid bilayer membranes on template-stripped gold, *Langmuir*. 26, 18239-18245
- Wang, X., Falk, M., Ortiz, R., Matsumura, H., Bobacka, J., Ludwig, R., Bergelin, M., Gorton, L., and Shleev, S. (2012), Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes, *Biosensors Bioelectron.* 31, 219-225

- Widrig, C. A., Chung, C., and Porter, M. D. (1991), The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline Au and Ag electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 310, 335-359
- Willner, I., Baron, R., and Willner, B. (2007), Integrated nanoparticle-biomolecule systems for biosensing and bioelectronics, *Biosensors Bioelectron.* 22, 1841-1852
- Xu, F., Shin, W., Brown, S. H., Wahleithner, J. A., Sundaram, U. M., and Solomon, E. I. (1996a), A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability, *Biochim Biophys Acta.* 1292, 303-311
- Xu, F., Shin, W., Brown, S. H., Wahleithner, J. A., Sundaram, U. M., and Solomon, E. I. (1996b), A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology.* 1292, 303-311
- Xu, F. (1997), Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases, *J. Biol. Chem.* 272, 924-928
- Xu, F., Berka, R. M., Wahleithner, J. A., Nelson, B. A., Shuster, J. R., Brown, S. H., Palmer, A. E., and Solomon, E. I. (1998), Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile, *The Biochemical journal.* 334 (Pt 1), 63-70
- Xu, F., Palmer, A. E., Yaver, D. S., Berka, R. M., Gambetta, G. A., Brown, S. H., and Solomon, E. I. (1999), Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase: Axial perturbations of the T1 copper, *J. Biol. Chem.* 274, 12372-12375
- Xu, X., Lu, P., Zhou, Y., Zhao, Z., and Guo, M. (2009), Laccase immobilized on methylene blue modified mesoporous silica MCM-41/PVA, *Mater. Sci. Eng., C.* 29, 2160-2164
- Yahiro, A. T., Lee, S. M., and Kimble, D. O. (1964), Bioelectrochemistry. I. Enzyme Utilizing Bio-Fuel Cell Studies, *Biochim Biophys Acta.* 88, 375-383

Yáñez-Sedeño, P., and Pingarrón, J. M. (2005), Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 884-886

Yaropolov, A. I., Skorobogat'ko, O. V., Vartanov, S. S., and Varfolomeyev, S. D. (1994), Laccase - Properties, catalytic mechanism, and applicability, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 49, 257-280

Zebda, A., Gondran, C., Le Goff, A., Holzinger, M., Cinquin, P., and Cosnier, S. (2011), Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes, *Nature communications.* 2, 370

Zhao, F., Slade, R. C. T., and Varcoe, J. R. (2009), Techniques for the study and development of microbial fuel cells: An electrochemical perspective, *Chem. Soc. Rev.* 38, 1926-1939

Zherdev, A. V., Bizova, N. A., Yaropolov, A. I., Lyubimova, N. V., Morozova, O. V., and Dzantiev, B. B. (1999), Laccase from *Coriolus hirsutus* as alternate label for enzyme immunoassay: Determination of pesticide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology.* 76, 203-215

FTIR spectroelectrochemical characterization of the Ni-Fe-Se hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

Antonio L. De Lacey · Cristina Gutiérrez-Sánchez ·
Víctor M. Fernández · Isabel Pacheco ·
Inês A. C. Pereira

Received: 10 June 2008 / Accepted: 1 August 2008
© SBIC 2008

Abstract For the first time a complete characterization by infrared spectroscopy of a Ni-Fe-Se hydrogenase in its different redox states is reported. The Ni-Fe-Se hydrogenase was isolated from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Two different electron paramagnetic resonance silent and air-stable redox states that are not in equilibrium were detected. Upon reduction of these states the catalytically active states Ni-R and Ni-C appear immediately. These states are in redox equilibrium and their formal redox potential has been measured. Putative structural differences between the redox states of the active site of the Ni-Fe-Se hydrogenase are discussed.

Keywords Hydrogenase · Infrared · Selenocysteine · Spectroelectrochemistry

Introduction

The structural and functional study of the active site of hydrogenases is of great interest because these metalloenzymes catalyze very efficiently the reversible oxidation of H_2 to protons and electrons, which is the fundamental reaction for using this gas as a clean energetic vector in different devices (fuel cells, electrolytic cells, and

photoelectrochemical cells) [1, 2]. Besides, there is great interest in the development of biomimetic catalysts for H_2 oxidation/production applications inspired by the structural and functional properties of the bimetallic active site of these enzymes [3, 4]. Hydrogenases are normally classified on the basis of the metallic composition of the active site and the vast majority of them can be divided into two large groups: Ni-Fe hydrogenases and Fe-Fe hydrogenases. Crystallographic structures of several hydrogenases of both groups have been determined in the last few years [5]. In most Ni-Fe hydrogenases the nickel atom is coordinated by four cysteine amino acids, two of them in a terminal position and the other two forming bridges with the Fe atom of the active site [6]. However, some Ni-Fe hydrogenases have a cysteine replaced by a selenocysteine that is terminally coordinated to the Ni atom of the active site, as X-ray diffraction [7], electron paramagnetic resonance (EPR) [8, 9] and X-ray absorption spectroscopy [10] studies have shown. This structural difference in the active site of Ni-Fe-Se hydrogenases greatly affects the spectroscopic and kinetic properties of the enzyme: (1) the oxidized states are EPR-silent, whereas standard Ni-Fe hydrogenases have paramagnetic Ni^{3+} ; (2) they become active immediately upon reduction, whereas most of Ni-Fe hydrogenases (as isolated under aerobic conditions) require a slow reductive activation process; (3) they catalyze faster the double isotope exchange of D_2 with protons than the single one, in contrast to standard Ni-Fe hydrogenases [11–13]. The H_2 production activity of Ni-Fe-Se hydrogenases is also higher than that of Ni-Fe hydrogenases, and physiologically this is reflected in the preferred expression of the Ni-Fe-Se hydrogenase by the microorganism when Se is available in the medium [14].

A common feature of hydrogenases is the presence in the active site of low-spin Fe coordinated by CO and CN^-

A. L. De Lacey (✉) · C. Gutiérrez-Sánchez · V. M. Fernández
Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC,
C/Marie Curie 2,
28049 Madrid, Spain
e-mail: alopez@icp.csic.es

I. Pacheco · I. A. C. Pereira
Instituto de Tecnologia Química e Biológica,
Universidade Nova de Lisboa,
Oeiras, Portugal

Enzymatic Anodes for Hydrogen Fuel Cells based on Covalent Attachment of Ni-Fe Hydrogenases and Direct Electron Transfer to SAM-Modified Gold Electrodes

Olaf Rüdiger,^{a,d} Cristina Gutiérrez-Sánchez,^a David Olea,^a Inês A. C. Pereira,^b Marisela Vélez,^{a,c} Víctor M. Fernández,^a Antonio L. De Lacey^{a*}

^a Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, c/ Marie Curie 2, 28049 Madrid, Spain

*e-mail: alopez@icp.csic.es

^b Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal

^c Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia (IMDEA-Nanociencia), Facultad de Ciencias, C-IX-3a Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^d Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie, Stiftstrasse 34-36, D-45470 Mülheim an der Ruhr, Germany

Received: June 15, 2008

Accepted: October 1, 2009

Abstract

Immobilization of hydrogenases onto electrodes is of great interest for developing biofuel cells that use H₂ as a fuel. In this way, hydrogenases replace Pt as electrocatalyst for oxidizing H₂ in the anode. We have developed a method of covalent bonding of *Desulfovibrio gigas* Ni-Fe hydrogenase and *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough Ni-Fe-Se hydrogenase to gold electrodes modified with a self assembled monolayer (SAM) of 4-aminothiophenol for measuring high electrocatalytic currents of H₂-oxidation in the absence of redox mediators. Electrochemical measurements and atomic force microscopy characterization show that direct electron transfer between enzyme and the Au support is due to formation of an organized monolayer of hydrogenase over the SAM-modified surface.

Keywords: Hydrogenases, Biofuel cells, SAM, Direct electron transfer, AFM, Fuel cells, Enzymes

DOI: 10.1002/elan.200880002

1. Introduction

Hydrogenases are redox metalloproteins that catalyze the oxidation of molecular hydrogen to water and the reverse reaction. Hydrogenases are classified according to their metal content [1]. The most studied group of hydrogenases have a Ni-Fe complex as active site, in which H₂ is formed or oxidized, and a chain of Fe-S clusters that relay electrons between the active site and the redox partner of the enzyme [2]. The attachment of hydrogenases to electrodes has great interest for biotechnological applications such as biofuel cells, electrolytic cells and biosensors. Research on the use of hydrogenase electrodes as anodes of biofuel cells is currently a hot topic because of the very high catalytic turnover of the enzyme for H₂-oxidation under mild conditions and low overpotential [3]. Thus, these hydrogenase electrodes are potential alternatives to conventional anodes of fuel cells using Pt as catalyst, which is a scarce and expensive noble metal.

Currently, the measurement of direct electron transfer between enzyme and electrode is a very important goal within the field of bioelectrocatalysis because it avoids the use of redox mediators, which normally are toxic and complicate the design of biotechnological applications such as biofuel cells and biosensors [4, 5]. Adequate control of surface chemistry at the electrode and good structural

knowledge of the used redox enzymes is necessary for achieving direct electron transfer. Formation of self-assembled monolayers (SAMs) of thiols on gold surfaces is one of the best methods to functionalize electrodes in a controlled and uniform way [6]. Gold surfaces modified with 4-aminothiophenol (4-ATP) have been studied by different techniques, including electrochemistry [7, 8], STM [9, 10], XPS [10, 11] and EXAFS [12]. These studies and others have shown that 4-ATP forms well-ordered monolayers on gold surfaces that are almost as dense as those of long-chain alkyl thiolates. An advantage of SAMs of aromatic thiols over those of alkyl thiols is that the delocalized π -electron distribution in the phenyl ring favors the electric connection between the electrode and redox molecules attached to the electrode. Because of these properties, 4-ATP-modified gold electrodes have been used for direct electron transfer of several redox proteins [13–17].

In this work we have modified gold electrodes with a monolayer of 4-ATP in order to generate amino groups on the electrode surface to which Ni-Fe hydrogenases could be anchored with adequate orientation for direct electron transfer. In previous works we have reported oriented and stable immobilization of *D. gigas* hydrogenase to carbon electrodes modified with 4-aminophenyl groups [18, 19]. The positively charged amino groups of the carbon surface orientated the immobilization of the hydrogenase according

Interaction of the active site of the Ni–Fe–Se hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough with carbon monoxide and oxygen inhibitors

Cristina Gutiérrez-Sánchez · Olaf Rüdiger ·
Víctor M. Fernández · Antonio L. De Lacey ·
Marta Marques · Inês A. C. Pereira

Received: 22 April 2010 / Accepted: 6 July 2010
© SBIC 2010

Abstract The study of Ni–Fe–Se hydrogenases is interesting from the basic research point of view because their active site is a clear example of how nature regulates the catalytic function of an enzyme by the change of a single residue, in this case a cysteine, which is replaced by a selenocysteine. Most hydrogenases are inhibited by CO and O₂. In this work we studied these inhibition processes for the Ni–Fe–Se hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough by combining catalytic activity measurements, followed by mass spectrometry or chronoamperometry, with Fourier transform IR spectroscopy experiments. The results show that the CO inhibitor binds to Ni in both conformations of the active site of this hydrogenase in a way similar to that in standard Ni–Fe hydrogenases, although in one of the CO-inhibited conformations the active site of the Ni–Fe–Se hydrogenase is more protected against the attack by O₂. The inhibition of the Ni–Fe–Se hydrogenase activity by O₂ could be explained by oxidation of the terminal cysteine ligand of the active-site Ni, instead of the direct attack of O₂ on the bridging site between Ni and Fe.

Keywords Hydrogenase · Infrared · Selenocysteine · Carbon monoxide


C. Gutiérrez-Sánchez · O. Rüdiger · V. M. Fernández ·
A. L. De Lacey (✉)
Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC,
c/Marie Curie 2,
28049 Madrid, Spain
e-mail: alopez@icp.csic.es

M. Marques · I. A. C. Pereira
Instituto de Tecnologia Química e Biológica,
Universidade Nova de Lisboa,
Oeiras, Portugal

Introduction

Hydrogenases are enzymes that catalyze the reversible oxidation of H₂ to protons. In the vast majority of hydrogenases the active site is formed by a bimetallic complex of Ni–Fe or Fe–Fe coordinated by thiolate groups and by CO and CN[−] ligands, which is a very unusual type of coordination in biological systems. In most Ni–Fe hydrogenases the Ni atom is coordinated by the side chains of four cysteine amino acids, two of them in a terminal position and the other two forming bridges with the Fe atom of the active site [1]. However, in some Ni–Fe hydrogenases one of the cysteines is replaced by a selenocysteine, as X-ray diffraction [2], EPR [3, 4], and X-ray absorption spectroscopy [5] studies have shown. The interesting aspect of these Ni–Fe–Se hydrogenases is that, although the chemical properties of Se and S are similar, the change of coordination from one cysteine to a selenocysteine does modify considerably the catalytic and spectroscopic features of the active site: (a) Ni–Fe–Se hydrogenases have higher H₂-production activity than H₂-oxidation activity, in contrast to most Ni–Fe hydrogenases; (b) Ni–Fe–Se hydrogenases become active immediately upon reduction, whereas most Ni–Fe hydrogenases (as isolated under aerobic conditions) require a slow reductive activation process; (c) the oxidized states of Ni–Fe–Se hydrogenases are EPR-silent, whereas standard Ni–Fe hydrogenases have EPR features assigned to paramagnetic Ni³⁺; (d) Ni–Fe–Se hydrogenases catalyze faster the double isotope exchange of D₂ with protons than the single one, in contrast to standard Ni–Fe hydrogenases [5–8]. These notable catalytic properties may explain why the Ni–Fe–Se hydrogenase is expressed preferentially over the other hydrogenases (Ni–Fe and Fe–Fe) in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* when Se is available in the medium [9].

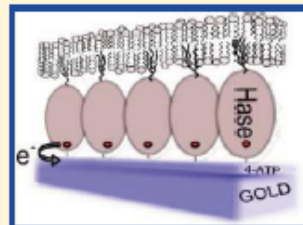
Published online: 29 July 2010

 Springer

Oriented Immobilization of a Membrane-Bound Hydrogenase onto an Electrode for Direct Electron Transfer

Cristina Gutiérrez-Sánchez,^{†,||} David Olea,^{†,||} Marta Marques,[§] Victor M. Fernández,[†] Inês A. C. Pereira,[§] Marisela Vélez,^{†,‡} and Antonio L. De Lacey^{*,†}[†]Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, C/Marie Curie 2, 28049 Madrid, Spain[‡]Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Nanociencia (IMDEA-Nanociencia), Facultad de Ciencias, C-IX-3^a Cantoblanco 28049, Madrid, Spain[§]Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Apartado 127, 2781-901 Oeiras, Portugal Supporting Information

ABSTRACT: The interaction of redox enzymes with electrodes is of great interest for studying the catalytic mechanisms of redox enzymes and for bioelectronic applications. Efficient electron transport between the biocatalysts and the electrodes has achieved more success with soluble enzymes than with membrane enzymes because of the higher structural complexity and instability of the latter proteins. In this work, we report a strategy for immobilizing a membrane-bound enzyme onto gold electrodes with a controlled orientation in its fully active conformation. The immobilized redox enzyme is the Ni–Fe–Se hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, which catalyzes H₂-oxidation reversibly and is associated with the cytoplasmic membrane by a lipidic tail. Gold surfaces modified with this enzyme and phospholipids have been studied by atomic force microscopy (AFM) and electrochemical methods. The combined study indicates that by a two-step immobilization procedure the hydrogenase can be inserted via its lipidic tail onto a phospholipidic bilayer formed over the gold surface, allowing only mediated electron transfer between the enzyme and electrode. However, a one-step immobilization procedure favors the formation of a hydrogenase monolayer over the gold surface with its lipidic tail inserted into a phospholipid bilayer formed on top of the hydrogenase molecules. This latter method has allowed for the first time efficient electron transfer between a membrane-bound enzyme in its native conformation and an electrode.



INTRODUCTION

Over the last few decades, much research has focused on developing suitable interfaces that are able to link biochemical processes catalyzed by redox enzymes to electrochemical ones, with the aim of improving the charge transport between the biocatalysts and the electrodes. The optimization of these interfaces allows the study of the catalytic mechanisms of redox enzymes^{1,2} and bioelectronic applications.^{3,4} This field has achieved more success with soluble enzymes than with membrane enzymes because of the higher structural complexity and instability of the latter proteins. Two general approaches have been used to interface membrane enzymes with electrodes: physisorption on electrodes, generally graphite ones, and immobilization on membrane-modified electrodes.⁵ The first approach has been successful in measuring direct electron transfer between the electrode and the hydrophilic subunits of some membrane enzymes.^{6,7} However, by this method the way that the membrane enzyme is bound to the electrode is uncertain, and there is no control over whether the enzyme maintains its integral conformation. Besides, the measured catalytic currents or the protein stability on the electrode is often low.^{6–8} However, the immobilization of redox membrane enzymes on gold electrodes modified with model membranes has allowed the electrochemical study of these enzymes in a lipidic

environment, which maintains their structural and functional integrity.^{9–11} However, by this latter strategy direct electron transfer between the enzymes and electrodes was not detected or was very sluggish, thus requiring the use of redox mediators. The reason for this is that these methods led to an orientation of the enzyme that is not optimal for direct electron transfer (DET), placing the redox center too far away from the electrode surface.⁵

Hydrogenases catalyze the oxidation of H₂ and its production from protons with almost no overpotential.¹² Therefore, their immobilization on electrodes holds potential interest for the development of biological fuel cells, electrolytic cells, and hydrogen biosensors.¹³ Many strategies have been reported for immobilizing hydrogenases on electrodes, such as physical adsorption,^{14–18} covalent bonding,^{19,20} entrapment in redox polymers,^{21,22} and layer-by-layer deposition.^{23,24} Charge exchange between the electrode and the hydrogenase has been achieved in some strategies by DET,^{14–18,20} whereas it has been achieved in others by mediated electron transfer (MET).^{19,21–24}

Received: January 12, 2011

Revised: March 31, 2011

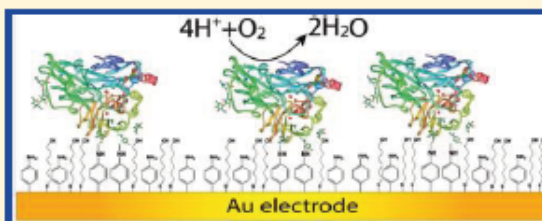
Published: April 14, 2011

High Redox Potential Cathode Based on Laccase Covalently Attached to Gold Electrode

Marcos Pita,^{*,†,§} Cristina Gutierrez-Sanchez,^{†,§} David Olea,[†] Marisela Velez,[†] Cristina Garcia-Diego,[†] Sergey Shleev,[†] Victor M. Fernandez,[†] and Antonio L. De Lacey^{*,†}[†]Instituto de Catalisis y Petroleoquímica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Marie Curie 2, 28049 Madrid, Spain[§]Biomedical Laboratory Science and Technology, Faculty of Health and Society, Malmö University, SE-205 06 Malmö, Sweden

S Supporting Information

ABSTRACT: A new strategy for oriented covalent immobilization of *Trametes hirsuta* laccase on gold electrodes is presented. The strategy is based on the gold surface modification with a mixed monolayer of an aromatic diazonium salt derivative and 6-mercapto-1-hexanol for further use as scaffold for the enzyme's covalent linkage. This strategy offers a variety of advantages such as high stability and laccase-friendly support morphology, which turns it into a suitable metal–enzyme interface. Conditions aiming at optimum orientation for direct electron transfer (DET) via the T1 copper site were studied. Current density values up to $40 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ were measured for the electrocatalytic reduction of O_2 in the absence of redox mediators. This strategy is a big step forward in the development of laccase-modified gold electrodes for bioelectrocatalytic reduction of O_2 .



INTRODUCTION

As the starvation of traditional fuel sources approaches, alternative sources of sustainable electrical energy, e.g., biofuel cells, have become a strategic research field.¹ Biofuel cells comprise two electrodes designed to harvest electric current from bioelectrocatalyzed chemical redox transformations. One of these electrodes is responsible for the oxidation of the fuel, typically hydrogen² or organic compounds,³ while the other electrode is responsible for the reduction of an oxidant, e.g., O_2 .⁴ These redox reactions are biocatalyzed by different enzymes⁵ and can occur directly at the electrodes or generate appropriate redox substrates from raw matter. Over the past two decades most of the technical challenges have been focused on developing suitable interfaces able to link the biochemical processes to the electrochemical ones, thus improving the charge transport between the biocatalysts and the electrodes.⁶ Many efforts aimed at the optimization of a biocatalytic anode suitable for biofuel cells.⁷ However, although there are several reported examples for biofuel cell cathodes,⁸ further development toward higher efficiency is still required.

Reduction of O_2 to H_2O is the most efficient reaction at the cathode for accepting the electrons produced at the anode. This reaction can be catalyzed by enzymes such as copper-containing oxidases.⁹ Laccases are blue multicopper oxidases that catalyze the oxidation of many polysubstituted benzene derivatives, lignins, and inorganic complexes with concomitant reduction of O_2 to H_2O .¹⁰ The active site of laccase comprises four copper ions, which are classified according to their electronic paramagnetic resonance (EPR) signals as the T1 copper and a trinuclear duster consisting on a T2 copper ion and two T3 copper ions.

The T1 copper ion and T2/T3 copper cluster are connected through a histidine–cysteine bridge allowing intramolecular electron transfer.^{9,10} T1 copper is recognized as the enzyme site for substrate oxidation, and the T2/T3 duster is recognized as the oxygen-reduction site. The redox potential of the T1 copper ion ranges approximately from 800 to 300 mV vs NHE for different laccases;⁹ e.g., *Trametes hirsuta* laccase has a potential of 780 mV (measured at pH 6.0).¹¹

Significant efforts have focused on developing a suitable electric connection between electrodes and laccases. There are two main targets for optimizing a laccase cathode: (i) to obtain the highest possible potential for O_2 electroreduction and (ii) to produce the most intense current density of the device. The first goal requires an immobilization method that allows the enzyme to transfer the electrons directly (direct electron transfer, DET) from the electrode to O_2 molecules using its biological T1-to-T2/T3 path, thus avoiding a mediated electron transfer (MET) bioelectrocatalysis. When DET is not efficient and a mediator is needed, an undesired decrease of the O_2 reduction's potential occurs. Maximization of the current output requires dense biocatalyst packing on the electrode surface, oriented in such a way that the DET mechanism is favorable.

Carbon electrodes have shown to be a very suitable electroactive surface for laccase accommodation.^{9,12,13} T1-to-surface is the statistically preferred orientation by adsorption of the

Received: April 19, 2011

Revised: May 27, 2011

Published: June 17, 2011



Laccase cathode approaches to physiological conditions by local pH acidification

Sylvain Clot^a, Cristina Gutierrez-Sanchez^a, Sergey Shleev^{b,1}, Antonio L. De Lacey^{a,*}, Marcos Pita^{a,*}

^a Instituto de Catalisis y Petrolequímica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Marie Curie 2, L10, 28049 Madrid, Spain

^b Biomedical Laboratory Science and Technology, Faculty of Health and Society, Malmö University, SE-205 06 Malmö, Sweden

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2011

Received in revised form 13 January 2012

Accepted 24 January 2012

Available online 31 January 2012

Keywords:

Laccase

Biofuel cell

Magnetic nanoparticles

Local pH

ABSTRACT

A new conceptual approach to improve the performance of a laccase-based cathode at neutral pH is presented. The working pH of *Trametes hirsuta* laccase, typically acidic, can be achieved by oxidation of biological compounds such as glucose catalyzed by a second enzyme immobilized in the vicinity of the laccase electrode.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Biofuel cells using enzymes as catalysts are promising alternative sources of sustainable electric energy for the future [1]. One of the potential applications is to power implantable biomedical devices, using naturally existing biochemical substances (e.g. glucose in biofluids) as fuel [2,3]. The oxidation of the organic compound takes place at a bioanode [4] and the reduction of the oxygen takes place at a biocathode [5]. While the anode has been the subject of extensive research and development [6], the performance of O₂ reducing cathodes needs improvement.

Trametes hirsuta laccase (ThLc) is a polyphenol oxidase able to reduce O₂ directly to H₂O at high potential, i.e. close to 780 mV vs. NHE [7]. Immobilization of ThLc on electrodes has allowed measuring high current densities of O₂ reduction at low overpotentials under optimum conditions of its enzymatic activity, overcoming the classic chloride inhibition limitation [8,9]. Besides chloride reversible inhibition, the main drawback when considering ThLc as an appropriate cathodic biocatalyst is its acidic pH optima (which ranges from 3 to 5), being almost completely inhibited at physiological pH. To overcome that limitation several approaches can be tested. Genetic manipulation of the enzyme for improving its activity close to neutral pH is a possibility, using either rational design or directed evolution, although it cannot be guaranteed that such a transformation will preserve its other catalytic properties [10]. Another approach takes

advantage of the electrode surface size. For implantable biofuel cells the presence of miniaturized electrodes is desirable, so the creation of a local acidic environment in the vicinity of the electrode is feasible due to its small size. Local pH changes produced by enzymatic reactions have already proved to produce measurable changes on pH-sensitive polyelectrolytes grafted to electrode surfaces [11,12]. If met with success, this approach could distinctively improve the performance of a ThLc-modified cathode under conditions where the bulk pH is several units above its activity range.

The present work seeks to identify a valid strategy for enhancing the ThLc performance under physiological conditions by generating a local acidic pH in the surroundings of the biocathode. An implantable biofuel cell should work as a fluidic system with a constant supply of glucose and O₂ from the biological fluid. Anodic reactions will consume part of that glucose and oxidize it to gluconic acid, pKa 3.86. Usage of a multiple enzyme bioanode [4] would produce additional acidic compounds such as 2,3-diketogluconate, locally increasing the acidity. Placing the biocathode next to the bioanode output would produce an acidification of biocathode environment; improving its performance in the case of a Lc-modified electrode.

2. Materials and methods

2.1. Enzymes

ThLc from the basidiomycete, strain *T. hirsuta* 56, was obtained from the laboratory collection of the Moscow State University of Engineering Ecology following the purification procedure previously reported [13]. Glucose oxidase (GOx) (*Aspergillus Niger* type II) and catalase (*Bovine liver*) were purchased from Sigma.

* Corresponding authors. Tel.: +34 91 585 4813; fax: +34 91 585 4760.

E-mail addresses: marcospita@icp.csic.es (M. Pita), alopez@icp.csic.es (A.L. De Lacey).

¹ Tel.: +46 406 657 414; fax: +46 406 65 81 00.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Electrochimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/electacta



Enhanced direct electron transfer between laccase and hierarchical carbon microfibers/carbon nanotubes composite electrodes. Comparison of three enzyme immobilization methods

Cristina Gutiérrez-Sánchez^a, Wenzhi Jia^b, Yvonne Beyl^b, Marcos Pita^a, Wolfgang Schuhmann^b, Antonio L. De Lacey^a, Leonard Stoica^{b,*}

^a Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, C/ Marie Curie, 2, 28049 Madrid, Spain

^b Analytische Chemie – Elektroanalytik & Sensorik, Ruhr-Universität Bochum, Universitätsstr. 150, D-44780 Bochum, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 December 2011
Received in revised form
28 December 2011
Accepted 29 December 2011
Available online xxx

Keywords:
Laccase
Carbon nanotubes
Biofuel cell
Biocathode
Oxygen reduction reaction
Hierarchical carbon composite
Direct electron transfer

ABSTRACT

Three immobilization protocols were investigated with respect to direct electron transfer between hierarchical carbon microfibers/carbon nanotubes composite material on graphite rod electrodes and *Trametes hirsuta* laccase. Immobilization was done by covalent binding of laccase to aminophenyl-modified electrodes via amide-bond formation with carboxylic acid residues or imino-bond formation with aldehyde groups introduced by oxidation of sugar residues of the enzyme's glycosylation shell. Moreover, immobilization was achieved by adsorbing laccase to electrodes hydrophilized with pyrene-hexanoic acid. High current densities for biocatalytic oxygen reduction were obtained for all immobilization strategies. The formation of the imino bonds led to the binding of laccase in close to 100% direct electron transfer configuration and consequently to the highest oxygen reduction currents.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Biofuel cell development is presently aiming on increasing current densities and extended cell potential as well as on the adaptation to physiological conditions [1–4]. For an implantable biocathode that catalyzes oxygen reduction in a four-electron transfer reaction directly to water, the maximum current output is limited on the one hand by the electron transfer kinetics between the electrode surface and the immobilized enzyme, the amount of enzyme which is in productive electron-transfer distance to the electrode surface and by the concentration of the dissolved oxygen. The maximum concentration of O₂ at physiological pH value and temperature is approximately 200 μM and depends on the specific tissue diffusion coefficient [5]. The highest possible potential can be obtained by selecting a suitable biocatalyst such as a high-redox potential laccase. The T1–Cu site, which is considered to be the site of direct electron transfer with the electrode, exhibits a potential of about +750 mV vs. NHE. Consequently, the properties of a biocathode can be improved by simultaneously optimizing the coupling of

the biocatalytic reduction of O₂ via direct electron transfer between the electrode and the suitably immobilized enzyme [6,7] and by securing a maximum availability of molecular oxygen [3]. As a matter of fact, direct electron transfer (DET) between a biocathode and an e.g. immobilized high-potential laccase can only occur for a limited number of enzyme molecules which are immobilized in an anisotropic orientation exposing the T1–Cu site towards the electrode surface. Evidently, DET assumes a monolayer of the enzyme to be in productive electron-transfer configuration [6,8]. Consequently, since enzyme multilayers or three-dimensional enzyme networks are impossible for efficient DET, the only possibility to improve the enzyme loading which is in DET configuration with the electrode surface is seen in a significant enlargement of the active electrode surface while keeping the overall dimensions of the used electrode constant.

A three-dimensional hierarchically structured carbon composite material was recently proposed using chemical vapor deposition of carbon microfibers (CMF) followed by the electrochemical deposition of iron as a catalyst for the subsequent growth of carbon nanotubes (CNT) on a supporting electrode material made of glassy carbon, graphite or carbon paper [9]. The modification of an electrode by means of these hierarchical carbon materials on the one hand substantially increases the active electrode surface by a factor

* Corresponding author. Tel.: +49 234 3225586; fax: +49 234 3214683.
E-mail address: leonard.stoica@rub.de (L. Stoica).